

CHARAKTERISTISCHE VERÄNDERUNGEN
DER MIKROHETEROGENITÄT
VON HUMANEM THYROGLOBULIN
IN ABHÄNGIGKEIT
VON UNTERSCHIEDLICHEM
JOD- UND SIALINSÄUREGEHALT

Günther Bechtner



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROFESSOR DR. E.BUCHBORN

**CHARAKTERISTISCHE VERÄNDERUNGEN
DER MIKROHETEROGENITÄT VON HUMANEM THYREOGLOBULIN
IN ABHÄNGIGKEIT VON UNTERSCHIEDLICHEM JOD-
UND SIALINSÄUREGEHALT***

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
GÜNTHER BECHTNER
aus München

1986

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(GA-272/1-1)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. K.Horn
Mitberichterstatter:	1. Prof. Dr. E.Buchborn 2. Prof. Dr. P.Schwandt
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. R.Gärtner
Dekan:	Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.1987

Meinen Eltern

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. K.Horn und
Herrn Dr. med. R. Gärtner
für die stetige Betreuung,
die unermüdliche Unterstützung und
die zahlreichen Anregungen
während der gesamten Zeit dieser Arbeit,

Frau Th.Kubiczek, Frau A.Isemann, sowie
den übrigen Mitarbeitern für die vielen
praktischen Tips und die stets gute Zusammenarbeit,

Frau F.Haag für die entgegenkommenden
Bemühungen bei der Anfertigung der
Abbildungen,

Herrn J.Henner für die hilfsbereite
Unterstützung bei der Bewältigung
technischer Probleme.

INHALT

1.	Einleitung	1
2.	Methodik	8
2.1.	MATERIAL	8
2.1.1.	Reagenzien	8
2.1.2.	Geräte	11
2.2.	METHODEN	13
2.2.1.	Messung von Proteinkonzentrationen	13
2.2.2.	Isolierung von Thyreoglobulin.....	17
2.2.3.	elektrophoretische Techniken.....	21
2.2.3.1.	Disc-Elektrophorese.....	21
2.2.3.2.	SDS-Elektrophorese.....	29
2.2.3.3.	Molekulargewichtsbestimmung durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen.....	37
2.2.4.	Isoelektrische Fokussierung.....	42
2.2.5.	Bestimmung des N-Acetyl-Neuraminsäure- Gehaltes von Thyreoglobulin.....	60
2.2.6.	chemische Gesamtjodbestimmung.....	68
2.2.7.	Jodthyroninbestimmung in Thyreoglobulin...	76

2.2.8.	Bestimmung von Jodidkonzentrationen mit einer ionenselektiven Jodidelektrode.....	81
2.2.9.	enzymatische in vitro Jodierung von Thyreoglobulin.....	84
2.2.10.	autoradiographischer Nachweis von endogen ^{131}I markiertem Thyreoglobulin in Seren...	88
3.	Ergebnisse	91
3.1.	Reinigung von Thyreoglobulin durch Chromatographie auf ACA 22 Ultrogel.....	91
3.2.	Untersuchung zur Reinheit des isolierten Thyreoglobulins.....	94
3.2.1.	Disc-Elektrophorese	94
3.2.2.	SDS-Elektrophorese	98
3.2.3.	Gradientengel-Elektrophorese	99
3.3.	N-Acetyl-Neuraminsäuregehalt von Thyreoglobulin.....	101
3.4.	Jod- und Jodthyroningehalt von Thyreoglobulin.....	102
3.5.	Isoelektrische Fokussierung von Threoglobulin.....	109
3.6.	endogen ^{131}I markiertes Thyreoglobulin aus Seren.....	119

4.	Diskussion	121
5.	Zusammenfassung	131
6.	Literatur	134
7.	Lebenslauf	156

1. Einleitung

Biosynthese von Thyreoglobulin

Thyreoglobulin ist ein von den Thyreozyten synthetisiertes Jodoprotein. An ihm erfolgen Synthese, Speicherung und Freisetzung der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4). Etwa 75% des gesamten Proteingehaltes der Schilddrüse stellt Thyreoglobulin (52). Vom chemischen Aufbau ist Thyreoglobulin ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 660 000 g/mol und einem Sedimentationskoeffizienten von 19S. Sein Kohlenhydratanteil beträgt etwa 10 Gewichtsprozent (24). Thyreoglobulin ist aus zwei identischen, nicht kovalent verbundenen Untereinheiten mit Sedimentationskoeffizienten von jeweils 12S, entsprechend einem Molekulargewicht von 330 000 g/mol, aufgebaut (1,129).

Wie bei anderen zur Sekretion bestimmten Glykoproteinen wird die primäre Peptidkette von Thyreoglobulin an großen Polyribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum der Thyreozyten synthetisiert (39,128). Durch Anheftung eines Peptides von 15 bis 40 Aminosäuren an das N-terminale Ende des entstehenden Moleküls kann Thyreoglobulin in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums gelangen (20,59). Die hierfür benötigte Peptidkette wird in den Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums dann wieder abgespalten (20). Bereits an dieser Stelle beginnt im rauen endoplasmatischen Retikulum die Glykosilierung der entstehenden Thyreoglobulin-Peptidkette durch Anheftung einer Kernzuckerkette bestehend aus N-Acetyl-Glukosamin und mehreren Mannose-Molekülen über N-Acetyl-Glukosamin an Asparaginreste

(4,69). Während des Transportes durch das raue endoplasmatische Retikulum zum Golgi-Apparat erfolgt die weitere Vervollständigung des Thyreoglobulinmoleküls durch Glykosilierung.

In humanem Thyreoglobulin sind bis heute vier verschiedene Zuckerketten bekannt, 8 A-Ketten und 22 B-Ketten, beide über Asparagin an die Peptidkette gebunden, sowie C- und D-Ketten.

Die A-Kette ist mit einem Molekulargewicht von 1 800 g/mol die kleinste. Sie enthält N-Acetyl-Glukosamin und Mannose. Die B-Kette ist verzweigt, besitzt ein Molekulargewicht von 2 100 bis 3 300 g/mol und besteht aus N-Acetyl-Glukosamin, Mannose, Fukose, Galaktose und N-Acetyl-Neuraminsäure. N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA) wird als letzter Zucker nach Galaktose an die B-Kohlenhydratketten von Thyreoglobulin (Tg) gebunden (88,118).

Mehrere Untersuchungen deuten auf eine mögliche Bedeutung des N-Acetyl-Neuraminsäure-Gehaltes von Thyreoglobulin im Schilddrüsenstoffwechsel hin. Nicht sialisiertes, sogenanntes asialo-Thyreoglobulin bindet mit weit größerer Affinität an Thyreozytenmembranen als sialisiertes Thyreoglobulin (24). So wurde der Fall eines experimentellen Schilddrüsentumors der Ratte beschrieben, in dem zwar Thyreoglobulin mit normaler Peptidstruktur synthetisiert, aber nicht in den Follikel abgegeben werden konnte. Als mögliche Ursache wurde eine stark eingeschränkte Aktivität der Sialyltransferase angenommen (85). Sialisierung ist also möglicherweise Voraussetzung für die Abgabe von neu synthetisiertem Thyreoglobulin in den Follikel und konsekutiv für Jodierung und Hormonsynthese (114). In einer anderen Untersuchung konnte eine an Thyreozytenmembranen gebunde-

ne Neuraminidaseaktivität nachgewiesen werden (24). Ihre Bedeutung liegt möglicherweise darin, Thyreoglobulin, das aus dem Follikellumen endozytiert werden soll, zu desialisieren, damit es dann an einen hypothetischen Thyreoglobulin-Rezeptor der apikalen Membran binden, so endozytiert und hydrolysiert werden kann.

Die C-Kette ist reich an Galaktosamin und ist o-glykosidisch an Serin oder Threonin gebunden. Die D-Kette schließlich, aufgebaut aus einer sich wiederholenden Sequenz des Disaccharids Glukuronsäure-Galaktosamin, ist über Galaktosylxylosyl an Serin gebunden (4,5,120).

Das vollständig synthetisierte aber noch nicht jodierte Thyreoglobulin wird über exozytotische Vesikel zur apikalen Membran des Thyreozyten transportiert und in das Follikellumen abgegeben.

Jodierung von Thyreoglobulin

An der apikalen Membran der Thyreozyten erfolgen Jodierung und Hormonsynthese am Thyreoglobulinmolekül (40). Hierzu werden vier Komponenten benötigt:

1. Thyreoglobulin

2. Jodid

Jodid wird vom Thyreozyten über die basale Membran entgegen einem Konzentrations- und elektrischen Gradienten aus dem Blut aufgenommen, im Zytoplasma angereichert und in das Follikellumen abgegeben (3, 143).

3. Die membrangebundene Thyreozyten-Peroxidase

Dieses Enzym wird gleichfalls wie Thyreoglobulin am rauen endoplasmatischen Retikulum des Thyreozyten synthetisiert und gelangt gebunden an die Membran exozytotischer Vesikel zur apikalen Membran (40,93).

4. Ein H_2O_2 generierendes System, das die Thyreozyten-Peroxidase aktiviert.

Dieses System ist vermutlich NADPH abhängig, konnte aber bis heute nicht identifiziert werden (40,93).

Die membrangebundene Thyreozyten-Peroxidase katalysiert sowohl die Jodierung der Tyrosylreste des Thyreoglobulinmoleküls unter Bildung von Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT), wie auch die Kopplungsreaktion von Dijodtyrosin und Monojodtyrosin zu T_3 oder von zwei Dijodtyrosinresten zu T_4 (48,93). Bemerkenswert hierbei ist, daß im Thyreoglobulinmolekül, das etwa 120 Tyrosyl-Reste enthält, bei mittlerem Jodierungsgrad nur 6 Tyrosyl-Reste zur Bildung von 3 T_4 -Molekülen, und nur 2 Tyrosyl-Reste zur Bildung eines T_3 -Moleküls Verwendung finden (71). Dies deutet darauf hin, daß es im Thyreoglobulinmolekül eine Peptidsequenz gibt, in der, begünstigt durch die chemische Struktur des Thyreoglobulinmoleküls, bevorzugt die Jodthyroninbildung erfolgt (32,35,66,67,68,82,105).

Untersuchungen von Salvatore und Edelhoach (113) ergaben, daß höher jodiertes Thyreoglobulin stabiler zu sein scheint als niedrig jodiertes Thyreoglobulin, das leichter in die 12S Untereinheiten dissoziiert. Thyreoglobulin enthält etwa 240 Cystein-Moleküle, von denen die meisten an innerkettigen Disulfidbrücken beteiligt sind (25). Nur 10 freie Sulfhydrylgruppen finden sich in unjodiertem Thyreoglobulin. Mit steigendem Jodgehalt nimmt die Zahl der freien SH-Gruppen ab, nach Salvatore et al. (113, 114) eine mögliche Erklärung für die höhere Stabilität von höher jodiertem Thyreoglobulin.

Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen gelang es Berg et al., den Einfluß des Jodgehaltes auf die Struktur von Thyreoglobulin direkt sichtbar zu machen. Während normal jodiertes Thyreoglobulin eine kompakte-

re, ovoide Struktur zeigte, war die von sehr niedrig jodiertem Thyreoglobulin zylindrisch und z.T. porös (10,11,12).

Biometabolismus von Thyreoglobulin

Zur Freisetzung von T_3 und T_4 wird Thyreoglobulin durch Makro- und Mikropinozytose aus dem Follikellumen in das Zytoplasma der Thyreozyten aufgenommen und konsekutiv enzymatisch hydrolysiert.

Neuere Untersuchungen erbrachten Hinweise, daß Thyreoglobulin auch in Vesikeln, die nicht mit primären Lyso-somen verschmelzen, durch den Thyreozyten transportiert und an der basolateralen Plasmamembran an Lymph- und Blutbahn abgegeben wird (54). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die bekannte Tatsache, daß Thyreoglobulin ein normaler Serumbestandteil ist, bei Schilddrüsengesunden in einer Konzentration bis etwa 50 ng/ml (42, 45,53).

In der Blutbahn zirkulierendes Thyreoglobulin wird wie andere Glykoproteine desialisiert, bevor es an Hepatozytenmembranen gebunden und anschließend in den Hepatozyten abgebaut wird (56,89).

Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich Thyreoglobulin bei verschiedenen Erkrankungen und Funktionsstörungen der Schilddrüse in seinem chemischen Aufbau verändert. Als Methode zum Nachweis möglicher Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung wurde isoelektrische Fokussierung eingesetzt.

Mit der isoelektrischen Fokussierung kann ein rein dargestelltes Protein, das sich bei anderen elektrophore-

tischen Methoden homogen verhält, häufig in mehrere Komponenten aufgetrennt werden. Man spricht dann von einer Mikroheterogenität dieses Proteins (141). Die Ursachen einer Mikroheterogenität können z.B. genetischer Natur sein (allele Gene, Mutationen), oder stoffwechselbedingt sein (Struktur- und Ladungsveränderungen bei Biosynthese, biologischer Funktion und Biodegradation eines Proteins) (141). Bereits geringfügige Veränderungen der chemischen Struktur eines Proteins während der Peptidbiosynthese, der Glykosilierung, des Biometabolismus und der Biodegradation können den isoelektrischen Punkt verändern, eine Mikroheterogenität entstehen lassen oder eine bereits bestehende Mikroheterogenität verschieben. Eine eingehende Erklärung von Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung eines Proteins erfordert somit Wissen über die einzelnen Schritte der Biosynthese und des Biometabolismus, sowie über Vorgänge während der biologischen Funktion dieses Proteins.

Auf die Bedeutung des N-Acetyl-Neuraminsäuregehaltes von Thyreoglobulin, sowie auf die Jodtyrosin- und Jodthyroninsynthese im Thyreoglobulinmolekül wurde bereits eingegangen. Sowohl natives, wie in-vitro vollständig desialisiertes Thyreoglobulin wurden mit isoelektrischer Fokussierung aufgetrennt. Auch wurden in zahlreichen Thyreoglobulinpräparaten der absolute Jodgehalt ebenso wie der Jodthyroningehalt bestimmt. Darüberhinaus wurden verschiedene Thyreoglobulinpräparate enzymatisch in-vitro jodiert, um maximalen Gesamtjod- und Jodthyroningehalt zu erreichen.

Bindung der relativ großen Jodatome und pK-Verschiebungen bei Jodtyrosin- und Jodthyronin-Bildung lassen Struktur- und Ladungsveränderungen im Thyreoglobulinmo-

lekül, somit auch Auswirkungen auf den isoelektrischen Punkt von Thyreoglobulin erwarten.

Mit der Festlegung eines "Normalwertes" für den isoelektrischen Punkt von Thyreoglobulin und der Beschreibung der wichtigsten physiologischen Schwankungen dieser physikochemischen Konstanten, sollten die Voraussetzungen für die Suche nach pathologischen Veränderungen des Thyreoglobulinmoleküls geschaffen werden.

2. Methodik

2.1. Materialien

2.1.1. Reagenzien

Zur **Extraktion von Schilddrüsengewebeschnitten** diene Diisopropylfluorophosphat der Firma Merck, Darmstadt, als Proteaseinhibitor.

Zur **Gelchromatographie** wurden ACA 22 Ultrogel der Firma LKB, Bromma, Schweden, und Blue-Dextran (MW = 2 000 000 g/mol) der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg, verwendet.

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Folin-Phenol-Reagenz gemessen. Hierzu wurden benötigt:

Phenol-Reagenz von Folin und Ciocalteu der Firma Merck, Darmstadt, sowie Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) der Firma Sigma, St. Louis, USA.

Zur **Polyacrylamidgel-Elektrophorese** (Disc-Elektrophorese, SDS-Elektrophorese, Gradientengel-Elektrophorese) wurden bezogen:

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), N,N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TMED), Ammoniumpersulphat, Silikon-Lösung, Triton-X-100, Serva-Violett 17, Serva Blau R und Trägerfolien für Polyacrylamidgele von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg; D-Saccharose, Bromphenolblau und 2-Mercaptoethanol von der Firma

Merck, Darmstadt; Polyacrylamid-Gradientengele PAA 4/30 (Trennbereich für globuläre Proteine: 50 000 - 2 000 000 g/mol) von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) von der Firma Sigma, St. Louis, USA; Filterpapiere (10,4 x 25,3 cm) von der Firma Whatman, Ferrieres, France.

Zur **isoelektrischen Fokussierung (IEF)** wurden verwendet:

Agarose IEF und Referenzproteine (Low pI Calibration Kit) von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; Ampholine pH 3,5 - 9,5 und pH 4,0 - 6,5; Trägerfolien für Agarosegele und Elektrodenstreifen für die Elektrofokussierung von der Firma LKB, Bromma, Schweden; Triton-X-100 von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

Zur **chemischen Messung von Jodidkonzentrationen** mit der Cer-Arsenit-Methode wurden benötigt:

Arsentrioxid (As_2O_3) und Ammonium-Cer(IV)-Sulfat ($(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) von der Firma Merck, Darmstadt; Brij-35 (30%ige Lösung) von der Firma Technicon, New York, USA;

Zur **enzymatischen in-vitro Jodierung** von Thyreoglobulin wurden bezogen:

β -D-Glukose und Kaliumjodid von der Firma Merck, Darmstadt; Laktoperoxidase und Glukoseoxidase von der Firma Boehringer, Mannheim; Methylmercaptoimidazol von der Firma Fluka, Neu-Ulm.

Zur Bestimmung des **N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA)**-Gehaltes von Thyreoglobulin wurden verwendet:

N-Acetyl-Neuraminsäure der Firma Sigma, St. Louis, USA; Natriumperjodat (NaIO_4) und Cyclohexanon von der Firma Merck, Darmstadt; Natriumarsenit (NaAsO_2) von der Firma Fluka, Neu-Ulm; Thiobarbitursäure von der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

Zur **enzymatischen Desialisierung** von Thyreoglobulin wurde Neuraminidase aus *vibrio cholerae* (E.C. 3.2.1.18) der Firma Behring, Marburg, verwendet.

Bovines Serum-Albumin (BSA) war ein Präparat der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg.

Autoradiographien wurden mit einem Kodak X-Ray-Film (Kodak X-OMAT AR Film) durchgeführt.

Alle weiteren verwendeten Reagenzien waren p.a. Präparate der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.2. Geräte

Zur **Gelchromatographie** wurde eine Chromatographieeinheit der Firma LKB, Bromma, Schweden, bestehend aus Schlauchpumpe, Photometer, 1-Kanal-Schreiber, Fraktionssammler und Arbeitskühlschrank verwendet.

Zur **Vakuumdialyse** wurden Kollodiumhülsen SM 13 200 und die zugehörige Apparatur der Firma Sartorius, Göttingen, eingesetzt.

Gefriertrocknung wurde mit einer Christ-Beta Vakuumpumpe durchgeführt.

Zur **colorimetrischen Messung von Proteinkonzentrationen** mit dem Folin-Phenol-Reagenz wurde ein Zeiss-Spektralphotometer verwendet.

Polyacrylamidgel-Elektrophoresen und isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden durchgeführt mit:

einer Elektrophoreseeinheit zur horizontalen Elektrophorese bestehend aus Elektrophoresekammer, Spannungsgerät und Kühlaggregat;

eines Zubehörsatzes zum Gießen von 2,0 mm dicken Polyacrylamidgelen, bestehend aus Grundglasplatte (26,0 x 12,5 x 0,3 cm), Silikongummi-Abstandhalter (26,0 x 12,5 x 0,2 cm), Deckglasplatte (26,0 x 12,5 x 0,3 cm) und 12 Halteklammern;

eines Zubehörsatzes zum Gießen von 0,5 mm dicken Kapillargelen bestehend aus Grundglasplatten (26,0 x 12,5 x 0,3 cm), Deckglasplatten mit Abstandhaltern (25,0 x 12,5 x 0,3 cm) und 2 Halteklammern, sowie Feuchtekam-

mern zur Aufbewahrung von Polyacrylamid- und Agarosegelelen von der Firma LKB, Bromma, Schweden;

der Elektrophoresekammer GE 2/4 zur vertikalen Elektrophorese von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden;

Die **chemische Bestimmung von Jodidkonzentrationen** nach der Cer-Arsenit-Methode wurde mit einem Technicon-Autoanalyzer durchgeführt.

Messungen von Jodidkonzentrationen mit ionenselektiver Jodidelektrode erfolgten mit einer Meßkette bestehend aus einem Mikroprozessor, einer ionenselektiven Jodidelektrode und einer Bezugselektrode mit Doppelschlüssel von der Firma Orion Research, Cambridge, USA.

Filtration und Konzentrieren von Seren ^{131}I -therapierter Patienten wurden mit Amicon B 125 Kammern, Firma Amicon, USA, durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Messung von Proteinkonzentrationen mit dem Folin-Phenolreagenz nach Lowry et al.

Theoretische Grundlagen

Die Proteinbestimmung mit dem Phosphomolybdän-Phosphowolfram-Reagenz (Reagenz von Folin und Ciocalteu) nach Lowry et al. (72) ist eine sehr empfindliche Methode Proteinkonzentrationen bis $< 1 \mu\text{g/ml}$ zu bestimmen. Die Reaktion führt in zwei Schritten zu einer Farbentwicklung, die photometrisch gemessen wird. Im ersten Schritt wird zu einer Proteinlösung eine alkalische Kupfersulfatlösung gegeben, was zur Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes führt. Dieser Protein-Kupfer-Komplex reduziert in einem zweiten Schritt das Phosphomolybdän-Phosphowolfram-Reagenz. Hierbei kommt es zu einer von der Proteinkonzentration abhängigen Farbentwicklung. Sie wird für Proteinkonzentrationen im Endansatz von $1 - 100 \mu\text{g/ml}$ bei dem Absorptionsmaximum von $\lambda = 750 \text{ nm}$, bei höheren Konzentrationen bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ photometrisch gemessen. In der Originalarbeit von Lowry et al. (72) wird darauf hingewiesen, daß verschiedene reine Proteine verschiedene Extinktionskoeffizienten mit dem Folin-Phenol-Reagenz ergeben. Deshalb sei darauf zu achten, zur Erstellung einer Eichkurve Referenzproteine mit einer der Probe vergleichbaren Farbentwicklung zu wählen (72). Peterson G.L. hingegen schreibt, daß er mit seinem modifizierten Assay (Inku-

bation der Proteine mit der alkalischen Kupfersulfatlösung in 0,5% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)) derartige Unterschiede nicht gefunden habe (99).

Praktische Durchführung

Die Messung von Proteinkonzentrationen wurde mit einer von Peterson G.L. (99) modifizierten Methode der Proteinbestimmung mit dem Folin-Phenol-Reagenz nach Lowry et al. (72) durchgeführt.

BENÖTIGTE LÖSUNGEN

Reagenz A: 49,0 ml 2,0 g% Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH
0,5 ml 0,5 g% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
0,5 ml 1,5 g% Na-Tartrat
2,5 ml 10,0 g% SDS

Die Lösung ist bei Raumtemperatur für mindestens 2 Wochen stabil.

Reagenz B: Phenolreagenz (von Folin und Ciocalteu)
1 : 2 mit aqua dest. verdünnt. Die Lösung ist bei Aufbewahrung in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur stabil.

Standardlösungen für die Eichkurve:

1000 - 500 - 250 - 125 - 63 $\mu\text{g/ml}$ bovines Serumalbumin (BSA) gelöst in 0,9 g% NaCl.

ANSATZ:

50 μ l Standardlösung
oder Probe in entsprechender Verdünnung
oder aqua dest. (Leerwert)

+ 1,0 ml Reagenz A

Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min

+ 0,1 ml Reagenz B

Mischen sofort nach Zugabe von Reagenz B und Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 30 min. Die Farbe ist für ca. 2 h stabil.

ABSORPTIONSMESSUNG UND AUSWERTUNG

Die Absorptionsmessung erfolgte bei $\lambda = 750$ nm mit einem Spektralphotometer.

Standards und Proben wurden in Doppelwerten angesetzt. Die Auswertung erfolgte anhand einer bei doppelt logarithmischer Auftragung linearen Standardeckurve (Abb.1).

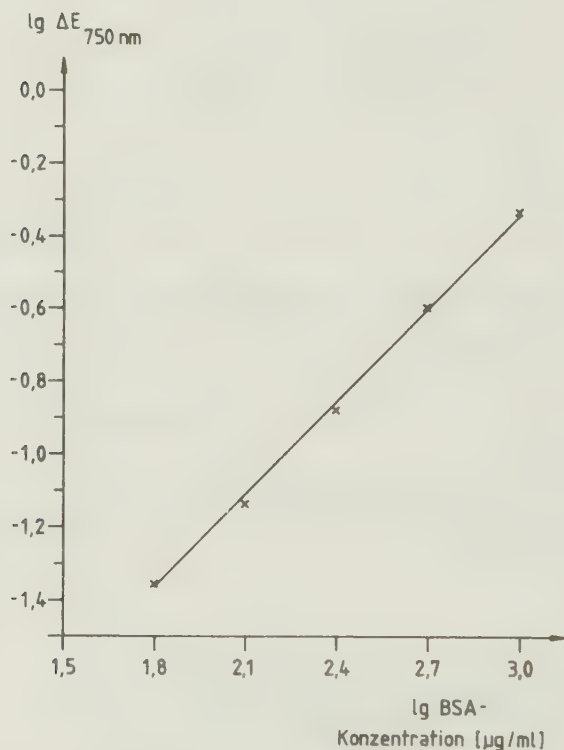


Abb.1: Standardeichkurve für bovines Serumalbumin (BSA) bei Proteinmessung mit dem Folin-Phenol-Reagenz in einer Modifikation der Methode nach Lowry et al. (72) von Peterson G.L. (99). Eine lineare Eichkurve entsteht im angegebenen Meßbereich durch Auftragung von $\lg \Delta E_{750 \text{ nm}}$ gegen $\lg \text{BSA-Konzentration}$. Die BSA-Konzentrationen beziehen sich auf die Konzentrationen der eingesetzten, unverdünnten Standardlösungen.

2.2.2. Isolierung von Thyreoglobulin

Thyreoglobulin wurde aus Schilddrüsenoperationsmaterial isoliert (diffuse und nodöse Strumen mit Euthyreose, kalte Knoten und Strumen bei M. Basedow). Das Operationsmaterial wurde unmittelbar im Anschluß an die Strumaresektion präpariert.*

Zur **Aufarbeitung des Operationsmaterials** wurden mit einem Handmikrotom feine (ca. 200 bis 500 µm dicke) Gewebeschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und 0,02 g% NaN_3 gelegt (10 - 20 ml bei 2 - 10 g Gewebe). Um eine Degradation des Thyreoglobulins durch Proteasen aus dem Schilddrüsen Gewebe zu verhindern, wurde dem Puffer 2 mM Diisopropylfluorophosphat als Proteaseinhibitor zugesetzt. Dieser Inkubationsansatz wurde für 3 Stunden bei + 4 °C in einem 100 ml Erlenmeierkolben geschüttelt. Anschließend wurde das Gewebe durch Zentrifugieren für 15 min bei 3 500 g sedimentiert. Der Überstand (10 - 20 ml bei 2 - 10 g Gewebe) wurde quantitativ abgehoben und direkt auf ein ACA 22 Ultrogel zur chromatographischen Reinigung des extrahierten Thyreoglobulins aufgetragen.

* Herrn Prof. Dr. med. Schaudig (Maria-Theresia-Klinik, München), sowie Herrn Dr. med. Permanetter und Herrn Dr. med. Barth (Krankenanstalt des Dritten Ordens, München) sei an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Operationsmaterials gedankt.

Chromatographie auf ACA 22 Ultrogel

SÄULENPRÄPARATION

Aus humanen Schilddrüsen isoliertes Thyreoglobulin wurde mittels Gelfiltration gereinigt. Als Matrix zur Gelchromatographie wurde ein sogenanntes ACA 22 Ultrogel verwendet, ein Polymer aus Acrylamid und Agarose. Die wichtigsten physikochemischen Eigenschaften dieses Gels waren ein Acrylamid- und Agarosegehalt von je 2%, ein Durchmesser der gequollenen Gelpartikel von 60 - 140 μm , ein linearer Trennbereich für globuläre Proteine von 100 000 - 1 200 000 g/mol, und eine Ausschlußgrenze von 3 000 000 g/mol.

Es wurde eine Säule mit den Maßen 3 x 100 cm (Durchmesser x Höhe) verwendet. Zu ihrer Herstellung wurden ca. 700 ml vorgequollenes ACA 22 Ultrogel mit ca. 300 ml Elutionspuffer verdünnt, um das Gel später besser in die Säule gießen zu können. Das so verdünnte Gel wurde in einem vakuumfesten Erlenmeierkolben mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast und anschließend luftblasenfrei in eine bei + 10 °C senkrecht aufgestellte, zunächst 140 cm lange Säule gegossen. Nach einer Sedimentationszeit von etwa einer Stunde wurde das Gel mittels einer Pumpe bei einer Flußrate von ca. 25 ml/h auf seine endgültige Länge von 100 cm gepackt. Der nur mit Puffer gefüllte Säulenteil konnte nun entfernt werden. Auf die Geloberfläche wurde ein feinporiges Teflonnetz geschraubt. Vor Gebrauch der Säule wurden: (1) das Gel mit 2 Säulenvolumina (ca. 1,5 l) entgastem Elutionspuffer gespült; (2) 10 ml einer 2%igen Rinderalbuminlösung eluiert, um mögliche

unspezifische Bindungsstellen der Gelmatrix abzusättigen; (3) erneut mit 1 l entgastem Elutionspuffer gespült.

Zur Beschreibung des Elutionsverhaltens einer Substanz wurden die folgenden Begriffe verwendet:

- V_t : das totale Säulenvolumen (Volumen von stationärer und mobiler Phase);
- V_0 ("void volume"): Elutionsvolumen für Moleküle, die sich nur in dem freien Kompartiment der mobilen Phase verteilen, da sie wegen ihrer Größe nicht in das Maschenwerk der stationären Phase eindringen können; entspricht dem Volumen des freien Kompartiments der mobilen Phase;
- V_e : Elutionsvolumen einer Fraktion, gemessen am Absorptionsmaximum;
- $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$: diejenige Fraktion des separierten

Kompartiments der mobilen Phase, die einer Probe zur Diffusion zugänglich ist. Ein $K_{av} > 1$ bedeutet, daß die Probe durch Interaktion mit der Gelmatrix der stationären Phase während der Elution retiniert wurde.

Durch Elution von 7 ml einer Blue Dextran 2000 Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde für die verwendete ACA 22 Ultrogelsäule ein V_0 von 250 ml bestimmt.

AUFTRENNUNG DER PROBEN

5 - 10 ml der Extrakte aus Schilddrüsengewebeschnitten (s.o.) wurden direkt auf das Teflonnetz der mit ACA 22 Ultrogel gepackten Säule aufgetragen. Nach Einsinken der Probe in das Gel wurden ca. 5 ml Elutionspuffer (0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und 0,02 g% NaN_3) auf das Teflonnetz geschichtet, um Probenreste in das Gel zu spülen. Anschließend wurde nochmals Elutionspuffer auf das Teflonnetz gegeben und mittels einer Pumpe bei einer Flußrate von ca. 15 ml/h eluiert. Das Elutionsprofil der Proteine wurde bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ photometrisch gemessen und mit einem Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet. Es wurden Fraktionen zu je ca. 6,5 ml gesammelt. Unter diesen Bedingungen dauerte eine Chromatographie ca. 48 Std.. Alle Schritte wurden bei + 10 °C durchgeführt.

Vakuumdialyse, Gefriertrocknung, Lagerung

Die Fraktionen der gelchromatographischen Reinigung von Thyreoglobulin (s.o.) wurden durch Vakuumdialyse ca. um das Zehnfache konzentriert. Dialysiert wurde gegen 0,05 M Ammoniumacetatlösung, um durch ausreichende Ionenkonzentration die Proteine in Lösung zu halten. Ammoniumacetat war bei der folgenden Gefriertrocknung flüchtig. Die konzentrierten Proteinlösungen wurden bei - 20 °C eingefroren und anschließend im Hochvakuum bei ca. 0,03 bar gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden in dicht schließenden Glasgefäßen bei - 20 °C gelagert.

2.2.3. Elektrophoretische Techniken

2.2.3.1. Disc-Elektrophorese

Theoretische Grundlagen

Disc-Elektrophorese ist eine hochauflösende Technik der Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Homogenität in der Disc-Elektrophorese wird allgemein als Kriterium für die Reinheit bzw. Integrität einer Substanz angesehen (80,97).

Der Name "Disc"-Elektrophorese leitet sich davon ab, daß die Probenauftrennung hier bei diskontinuierlichem pH-Wert, diskontinuierlichem Spannungsgradienten und diskontinuierlicher Gelkonzentration erfolgt (97). Namensgebend war ferner, daß sich bei der ursprünglichen Durchführung in stabförmigen Gelen die aufgetrennten Proben als feine Scheiben, als "Discs" darstellen (97).

Die Probenauftrennung läuft bei der Disc-Elektrophorese in zwei aufeinanderfolgenden Schritten ab: Konzentrierung und Schichtung der Proben in einem Sammelgel und Auftrennung in einem Trenngel (80,97).

Im Sammelgel ist die Gelkonzentration relativ niedrig (großporiges Gel) und der Spannungsgradient groß. Die relative Mobilität (2.2.3.2.) einer Substanz beruht hier weitgehend auf ihrer Ladung. Zwischen einer Front voranlaufender Ionen, deren Mobilität größer als die der Probe ist, und einer Front nachlaufender Ionen mit geringerer Mobilität werden die in einer Probe enthal-

tenen Substanzen in äußerst schmalen Zonen konzentriert und entsprechend ihrer relativen Mobilität geschichtet (97).

Das sich anschließende Trenngel unterscheidet sich vom Sammelgel durch eine höhere Gelkonzentration (kleinporiges Gel), den pH-Wert des enthaltenen Puffers, sowie einen geringeren Spannungsgradienten. Beim Übertritt vom Sammel- zum Trenngel ändern sich aufgrund des anderen pH-Wertes und der kleineren "Porengröße" die relativen Mobilitäten. Die Front der der Probe nachlaufenden Ionen überläuft nun die Probesubstanzen und folgt unmittelbar der voranlaufenden Ionenfront (97). Die Proben werden jetzt infolge Interaktion mit dem Trägergel weitgehend nach ihrer Molekülgröße und Molekülform aufgetrennt (97). Elektrische und Diffusions-Kräfte bewirken hierbei eine gewisse Verbreiterung der Zonen, in denen die Proben im Sammelgel ursprünglich hoch konzentriert waren (97).

Es besteht aber die Möglichkeit, daß Substanzen unterschiedlicher Ladungsdichte und Molekülgröße bzw. -form sich als eine Fraktion darstellen. Deshalb ist es zum Nachweis der Reinheit einer Substanz erforderlich, die Elektrophorese bei verschiedenen Trenngelkonzentrationen durchzuführen (80).

Praktische Durchführung

BENÖTIGTE LÖSUNGEN

Tabelle I

Lösungen zur Herstellung der Polyacrylamidgele

	Trenngel	Sammelgel
	*)T = 5,0 / 7,5 % *)C = 3,0 / 2,7 %	*)T = 3,0 % *)C = 3,0 %
Lösung I: Acrylamid- lösung	19,4/29,2 g Acrylamid 0,6/ 0,8 g Bis ad 100 ml aqua dest.	11,6 g Acrylamid 0,4 g Bis ad 100 ml aqua dest.
Lösung II: Gel-Puffer- lösung	36,3 g Tris 0,23 ml TMED pH 8,9 mit rauchender HCl einstellen ad 100 ml aqua dest.	5,7 g Tris 0,46 ml TMED pH 6,7 mit ortho-Phos- phorsäure einstellen ad 100 ml aqua dest.
Lösung III: Katalysator- lösung	0,14 g Ammonium- persulfat ad 100 ml aqua dest.	0,20 g Ammonium- persulfat ad 100 ml aqua dest.

*) Bei Polyacrylamidgelen ist es möglich, die "Porengröße" entsprechend der aufzutrennenden Substanz zu variieren (80,97). Diese Gelzusammensetzung wird mit den beiden Parametern Gel-Acrylamidkonzentration T und Gel-Vernetzungsgrad C beschrieben. Die Gel-Acrylamidkonzentration errechnet sich aus der Summe der Konzentrationen des Monomers Acrylamid (a) und des Komonomers N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) (b) und wird als T-Wert in Prozent des Gelvolumens (V) angegeben:

$$T = \frac{a + b}{V} \cdot 100 \%$$

Der Gel-Vernetzungsgrad C errechnet sich als prozentualer Anteil des Komonomers Bis an der gesamten eingesetzten Acrylamidmenge:

$$C = \frac{b}{a + b} \cdot 100 \%$$

Die Einheiten für a und b sind das Gramm (g), für V der Milliliter (ml). Höhere T und niedrigere C Werte werden bei niedermolekularen Substanzen verwendet und umgekehrt. Ein T von 7,5% und ein C von 3% sind für Proben mit einem Molekulargewicht von 10^4 - 10^6 g/mol gebräuchlich.

Mischungsverhältnisse für die Lösungen zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen:

- je:
- 2 Volumenteile Lösung I
 - 1 Volumenteil Lösung II
 - 1 Volumenteil aqua dest.
 - 4 Volumenteile Lösung III

Elektrodenpuffer pH 8,3:

- | | | |
|--------------------|---|--------|
| - Stammpuffer: | Tris (0,05 M) | 6,0 g |
| | Glycin (0,38 M) | 28,8 g |
| | ad 1000 ml aqua dest. | |
| - Gebrauchspuffer: | Stammpuffer 1 : 10 mit aqua dest. verdünnen | |

Probenpuffer pH 6,7:

- 0,05 M Tris
- pH 6,7 mit ortho-Phosphorsäure einstellen
- 10 - 20 g% Sacccharose
- 1 g% Bromphenolblau

Fixier- und Färbelösung:

0,1 g% Serva Violett 17 in Entfärbelösung

Entfärbelösung:

- 7 Volumenteile Methanol (96%ig)
- 2 Volumenteile Essigsäure (96%ig)
- 11 Volumenteile aqua dest.

HERSTELLUNG DER POLYACRYLAMIDGELE

Disc-Elektrophorese wurde in Polyacrylamid-Stabgelen durchgeführt. Die zum Gießen der Gele benötigten Glasröhrchen (15 cm Höhe, 0,6 cm Innendurchmesser) wurden mit Silikonlösung benetzt und 1 Stunde bei + 100 °C in einem Wärmeschrank getrocknet. Die Silikonisierung war notwendig, um eine ausreichende Haftung der Polyacrylamidgele an den Glasröhrchen zu erreichen, und um eine Adsorption von Probe an das Glas zu verhindern. Zum Gießen der Gele wurden die Glasröhrchen vertikal in einen Ständer gesteckt, der sie nach unten abdichtete.

Für die Herstellung des Trenngels wurden Acrylamid- und Pufferlösung im angegebenen Verhältnis (Tab.I) zum erforderlichen Volumen zusammenpipettiert und parallel zu

einem gleichen Volumen Ammoniumpersulfatlösung entgast. Beide Lösungen wurden anschließend vereinigt, kurz gemischt und luftblasenfrei bis zu einer Höhe von 11,5 cm in die Glasröhrchen gegossen. Um nach der Polymerisation eine ebene Oberfläche des Trenngels zu erhalten, wurde auf die Gellösung ein 4 - 5 mm hoher Film aqua dest. geschichtet, ohne dabei die beiden Phasen miteinander zu vermischen. Die Polymerisationsreaktion war bei Raumtemperatur nach ca. 30 min abgeschlossen. Der aqua dest. Film wurde nun mit einem Filterpapier entfernt und ein 2 cm hohes Sammelgel in entsprechender Weise auf das Trenngel gegossen. Bis zur Verwendung wurden die Gele mit Probenpuffer überschichtet und bei + 4 °C gelagert.

PROBENBEREITUNG

Gefriergetrocknetes salzfreies Protein wurde zu einer Konzentration von 0,4 - 4,0 µg/µl in Probenpuffer gelöst. Proteinlösungen wurden zu entsprechender Konzentration in Probenpuffer verdünnt.

ELEKTROPHORESE

Disc-Elektrophorese wurde in Polyacrylamid-Stabgelen mit einem System zur vertikalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt (Abb.2). Die Elektrophorese wurde unter Kühlung auf ca. + 15 °C zur Anode hin ausgeführt.

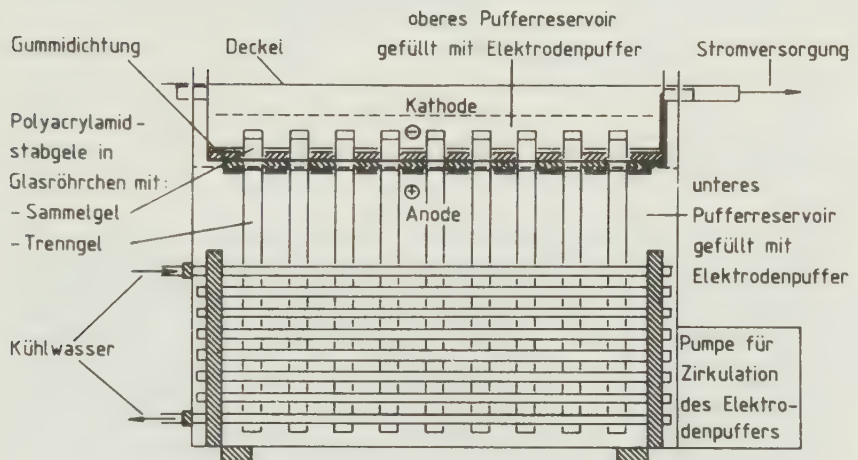


Abb.2: schematischer Aufbau der Apparatur zur vertikalen Disc-Elektrophorese in Polyacrylamid-Stabgelen

Ein 30 minütiger Vorlauf erfolgte bei 1 - 2 mA pro Stabgel.

Zur Probenauftragung wurden 50 μ l (= 20 - 200 μ g) Probe auf das Sammelgel unter den Elektrodenpuffer geschichtet.

Bei einer Stromstärke von 1 - 2 mA pro Stabgel wanderten die Probelösungen in das Sammelgel und wurden hier in einer schmalen Zone - sichtbar durch das zugegebene Bromphenolblau - konzentriert (ca. 15 min).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 bis 6 mA pro Stabgel, bis die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte (ca. 4 h).

PROBENNACHWEIS

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Glasröhrchen aus der Elektrophoresekammer entnommen. Mittels einer Spritze und einer langen feinen Kanüle wurde aqua dest. unter Drehen der Glasröhrchen zwischen Glasröhrchenwand und Gel injiziert, bis sich die Polyacrylamid-Stabgele aus den Röhrchen lösten. Die Gele wurden dann in Färbelösung, die zugleich Fixierlösung war, ca. 12 h (meist über Nacht) gefärbt. Entfärbt wurde unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung bis der Gelhintergrund klar war (ca. 24 h). Die gefärbten Gele konnten in mit Entfärbelösung gefüllten Reagenzgläsern aufbewahrt werden.

2.2.3.2. SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen

Theoretische Grundlagen

Eine Vielzahl reduzierter Proteine bindet, berechnet auf Gramm pro Gramm Basis, gleiche Mengen des anionischen Detergens SDS (**S**odium-**D**odecyl-**S**ulfat) (107). SDS und das reduzierende Agens (meist 2-Mercaptoethanol oder Dithiotreitol) lösen Wasserstoffbrückenbindungen, Bindungen durch hydrophobe Wechselwirkung und Disulfidbrücken (116). Durch die Anlagerung von SDS-Molekülen an die Peptidkette werden die proteineigenen Ladungen "abgedeckt", während pro SDS-Molekül eine negative Ladung eingeführt wird. Der Proteinanteil der SDS-Proteinkomplexe erhält unter diesen Bedingungen eine stabförmige Struktur von annähernd einheitlichem Durchmesser und einer Länge, die allein vom Molekulargewicht abhängt (107).

Durch die Assoziation von SDS an reduzierte Proteine entstehen aus Proteinmolekülen äußerst verschiedener Ladung und Form Moleküle gleicher Ladungsdichte und ähnlicher Form. SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen ergibt somit eine Auftrennung von **Proteinuntereinheiten** nach Molekulargewicht (116,138).

Praktische Durchführung

BENÖTIGTE LÖSUNGEN

Acrylamidlösung:

- Acrylamid 22,2 g
- N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) 0,6 g
- aqua dest. ad 100 ml

Ammoniumpersulfatlösung:

150 mg Ammoniumpersulfat ad 10 ml aqua dest.

Pufferstammlösung (0,2 M, pH 7,1):

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 39 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 128 g
- SDS 10 g
- in 1 l aqua dest. lösen und dann auf 5 l mit aqua dest. verdünnen

Elektrodenpuffer (0,1 M, pH 7,1):

Pufferstammlösung 1 : 2 mit aqua dest. verdünnen

Probenpuffer:

- Pufferstammlösung 5,0 ml
- 2-Mercaptoethanol 1,0 ml
- SDS 1,0 g
- aqua dest. ad 100 ml

Bromphenolblaulösung (0,25%ig):

25 mg Bromphenolblau in 10 ml Probenpuffer lösen

Detergenslösung:

0,1 ml Triton X-100 in 100 ml aqua dest. lösen

Fixierlösung:

- Trichloressigsäure 57 g
- Sulfosalicylsäure 17 g
- Methanol (96%ig) 150 ml
- aqua dest. 350 ml

Färbelösung:

- 1,25 g Serva Blau R in
- 227 ml Methanol (96%ig) lösen,
- 227 ml aqua dest. und
- 46 ml Essigsäure (96%ig) zugeben

Entfärbelösung:

- Methanol (96%ig) 300 ml
- Essigsäure (96%ig) 100 ml
- aqua dest. ad 1000 ml

Konservierungslösung:

- Entfärbelösung 450 ml
- Glycerin (87%ig) 50 ml

HERSTELLUNG DER SDS-POLYACRYLAMIDGELE

SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen wurde in Polyacrylamid-Flachbettgelen (25,0 x 11,5 x x 0,2 cm) mit einem System zur horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt (Abb.4).

Um die Formgeber der Gießform für die Probenauftragungsstellen (Abb.3A) herzustellen, wurden 20 Lagen Tesafilm (0,05 mm je Lage) aufeinandergeklebt und mit einem Skalpell entsprechend zurechtgeschnitten.

Zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels mit $T = 5,1\%$ und $C = 2,6\%$ wurden folgende Lösungen benötigt:

- aqua dest.	14,9 ml
- Pufferstammlösung	33,0 ml
- Acrylamidlösung	14,8 ml
- Ammoniumpersulfatlösung	3,2 ml
- TMED	<u>0,1 ml</u>
	66,0 ml

Aqua dest., Puffer- und Acrylamidlösung wurden zusammenpipettiert und mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Anschließend wurden Ammoniumpersulfatlösung und TMED zugegeben, kurz gemischt, und die gesamte Lösung in die Gießform gefüllt (Abb.3B). Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 30 - 45 min bei Raumtemperatur) wurde das auf der Trägerfolie haftende Polyacrylamidgel aus der Gießform entnommen und vor Gebrauch mindestens 12 Stunden und maximal 4 Tage bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gelagert.

PROBENBEREITUNG

Gefriergetrocknetes, salzfreies Protein wurde zu einer Konzentration von $2 \mu\text{g}/\text{dl}$ in Probenpuffer gelöst und 3 Stunden bei $+ 37^\circ\text{C}$ inkubiert. Dann wurden pro $250 \mu\text{l}$ Probe $10 \mu\text{l}$ Bromphenolblaulösung und $10 \mu\text{l}$ 2-Mercaptoethanol zugegeben und alles gut gemischt.

Referenzproteine (High Molecular Weight Kit, Pharmacia) wurden zu einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ je Referenzprotein in Probenpuffer gelöst. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei den Probesubstanzen.

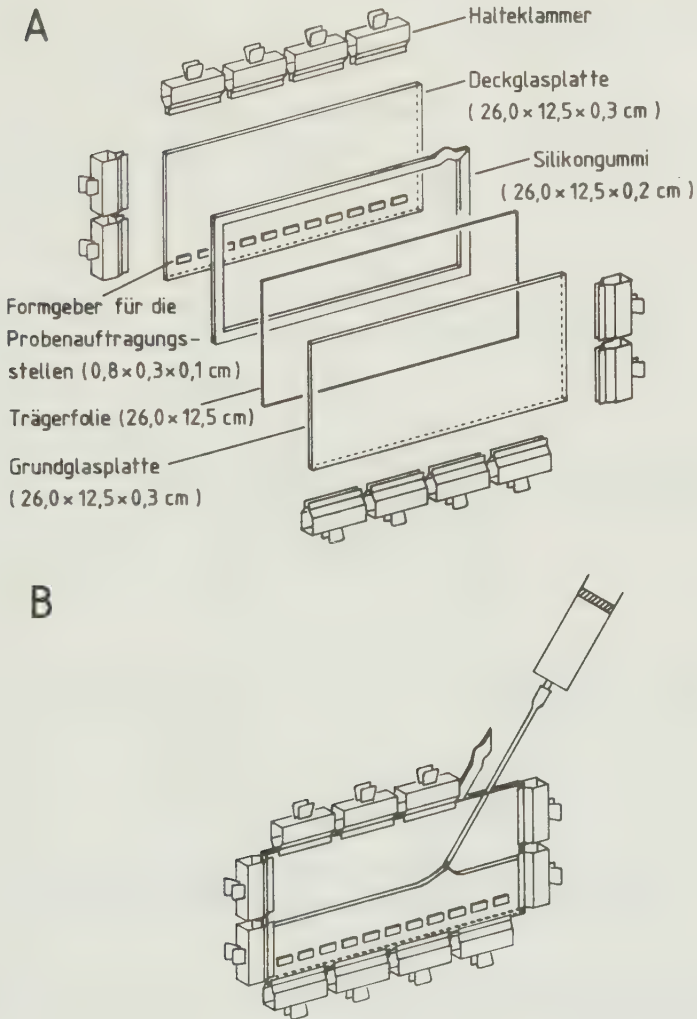


Abb. 3:

- A: Aufbau einer Form zum Gießen von Polyacrylamid-Flachgelen für die horizontale Polyacrylamidgелеlektrophorese
- B: Gießen eines Polyacrylamid Flachgels

ELEKTROPHORESE

SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen wurde mit einem System zur horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt (Abb.4). Die Elektrophorese wurde bei Kühlung auf $+ 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Anode hin ausgeführt.

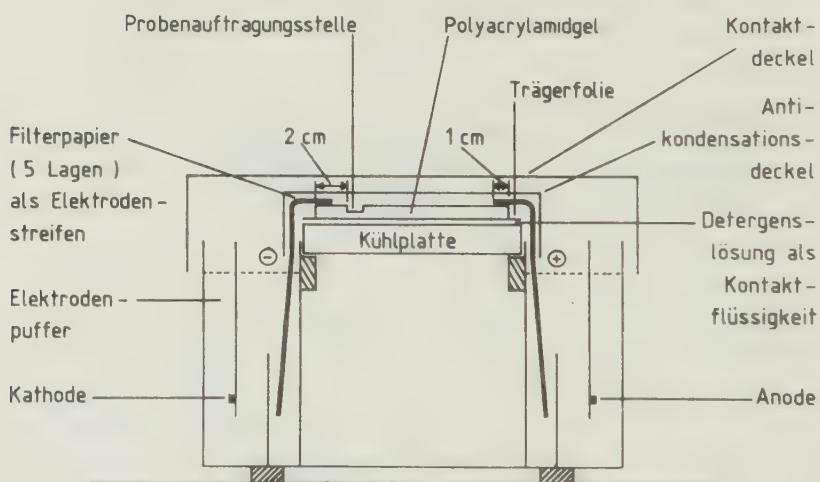


Abb.4: schematischer Querschnitt durch die Anlage zur horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Ein 30 minütiger Vorlauf wurde bei 6 mA/cm Gellänge durchgeführt.

Zur Probenauftragung wurden je $10\text{ }\mu\text{l}$ Probe ($= 20\text{ }\mu\text{g}$ Protein) in jede Auftragsstelle pipettiert.

Bei einer Stromstärke von $0,8\text{ mA/cm}$ Gellänge konnten die Probenlösungen in das Gel wandern und dort konzentriert werden (ca. 10 min).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 8 mA/cm Gellänge, bis die Bromphenolblaubanden ca. 1 cm von der Anode entfernt waren (ca. 5 h).

PROBENNACHWEIS

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das auf der Trägerfolie haftende Polyacrylamidgel aus der Elektrophoresekammer entnommen, 1 h fixiert, 2 h gefärbt, und entfärbt, bis der Gelhintergrund klar war (ca. 24 h).

Zur Aufbewahrung wurde das Polyacrylamidgel ca. 24 h in Konservierungslösung gelegt, anschließend mit einer Cellophanfolie überspannt und unter Pressen getrocknet.

AUSWERTUNG

Färberisch nachweisbare Proteinbanden wurden durch ihre relativen Mobilitäten beschrieben. Die relative Mobilität R_f ist folgendermaßen definiert:

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke einer Probe gemessen von ihrer Auftragsstelle}}{\text{Entfernung Auftragsstelle - Referenzpunkt}}$$

Bezugspunkt für die Berechnung der R_f -Werte war das anodale Gelende.

Die Molekulargewichte der färberisch nachweisbaren Probenbestandteile wurden im Vergleich mit dem elektrophoretischen Verhalten von Referenzproteinen bestimmt. Hierzu wurden in einer Eichkurve die Logarithmen der bekannten Molekulargewichte der Referenzsubstanzen gegen deren R_f -Werte aufgetragen (Abb.5).

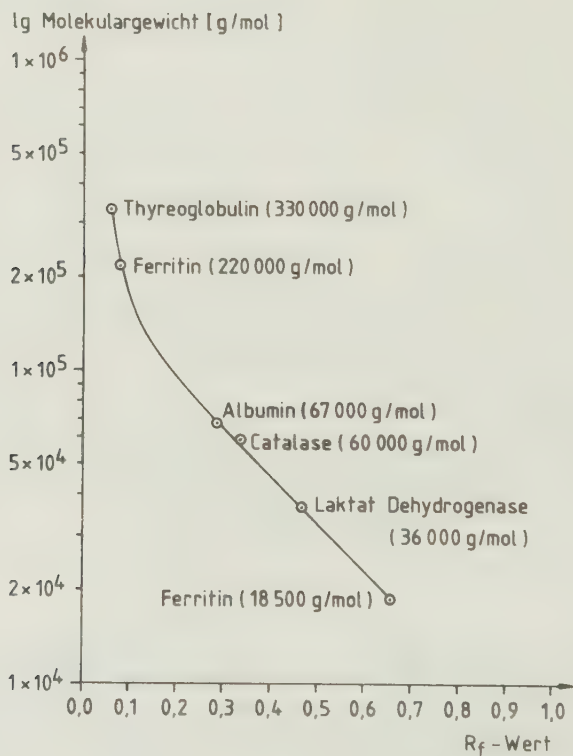


Abb.5: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinuntereinheiten durch SDS-Polyacrylamid-gel-Elektrophorese

2.2.3.3. Molekulargewichtsbestimmung mittels Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen

Theoretische Grundlagen

Bei der Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen wandert eine Probesubstanz von Bereichen niedrigerer in Bereiche höherer Gelkonzentration. Im Gegensatz zur konventionellen Elektrophorese besitzt die elektrophoretische Auftrennung hier abhängig von der "Porenweite" des Gels und der Molekülgröße der Probesubstanz einen Endpunkt. An diesem Endpunkt werden die Probesubstanzen in schmalen "Banden" konzentriert, und Diffusionskräfte kontinuierlich antagonisiert. Von den Haupttrennkriterien einer Elektrophorese - Ladungsdichte, Molekülgröße, Molekülform - wird die Molekülgröße (z.T. auch die Molekülform (75)) zum bestimmenden Trennkriterium (41, 73, 74, 144).

Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen ermöglicht die elektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung **nativer** Proteine. Um korrekte Werte zu erhalten, muß der Endpunkt der elektrophoretischen Auftrennung für jede Probesubstanz durch eine über das übliche Zeitmaß hinaus verlängerte Elektrophorese bestimmt werden.

Praktische Durchführung

BENÖTIGTE LÖSUNGEN

Elektrodenpuffer pH 8,4:

- | | |
|----------------------|----------|
| - Tris | 0,09 M |
| - Borsäure | 0,08 M |
| - EDTA-Dinatriumsalz | 0,93 g/l |

Probenpuffer:

- | | |
|-----------------------|---------|
| - Bromphenolblau | 1 g/dl |
| - Saccharose | 20 g/dl |
| - in Elektrodenpuffer | |

Fixierlösung:

- 10 g/dl Sulfosalicylsäure in aqua dest.

Entfärbelösung:

- 7%ige Essigsäure

Polyacrylamid-Gradientengele:

Es wurden Polyacrylamid-Gradientengele der Firma Pharmacia (8,0 x 8,0 x 0,27 cm) verwendet. Der Polyacrylamidgradient hatte eine Konzentrationsspanne von 4 bis 30%. Der angegebene Trennbereich für globuläre Proteine erstreckte sich von 50 000 - 2 000 000 g/mol.

PROBENBEREITUNG

Gefriergetrocknetes, salzfreies Protein wurde zu einer Konzentration von $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Probenpuffer gelöst. Probelösungen wurden zu entsprechender Konzentration in Probenpuffer verdünnt.

Referenzproteine wurden zu einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ je Referenzprotein in Elektrodenpuffer gelöst, der 1 g/dl Bromphenolblau enthielt.

ELEKTROPHORESE

Die elektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung in Polyacrylamid-Gradientengelen wurde mit einem System zur vertikalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt (Abb.6). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei Kühlung auf $+ 15^\circ\text{C}$ zur Anode.

Ein 20 minütiger Vorlauf wurde bei 70 V durchgeführt.

Zur Probenauftragung wurden je $10 \mu\text{l}$ Probenlösung ($= 15 \mu\text{g}$ Protein) im Probenapplikator unter den Elektrodenpuffer direkt auf die Geloberfläche geschichtet.

Bei einer Spannung von 70 V konnten die Proben in das Gel wandern und dort in schmalen "Banden" konzentriert werden (ca. 20 min).

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 V für 16 bzw. 24 Stunden.

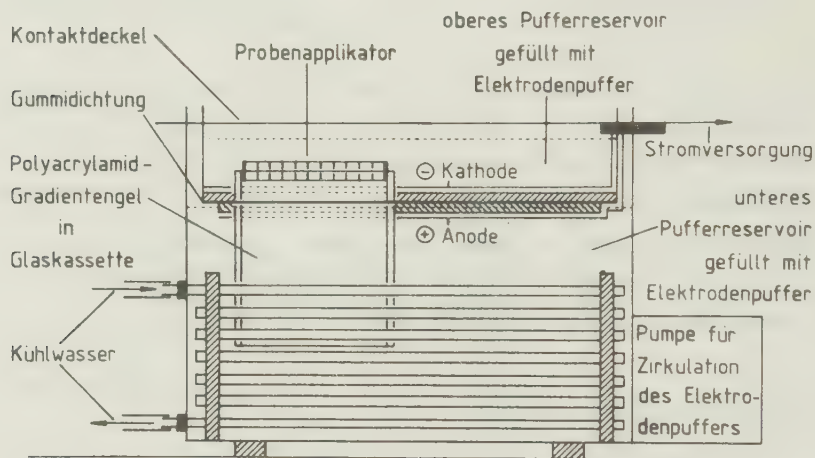


Abb. 6: schematischer Aufbau der Apparatur zur vertikalen Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen

PROBENNACHWEIS

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gradientengele aus ihren Glaskassetten entnommen, 30 min fixiert, und ca. 12 h (meist über Nacht) gefärbt. Entfärbt wurde unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung bis der Gelhintergrund klar war (ca. 24 h). Die gefärbten Gele konnten in Entfärbelösung aufbewahrt werden.

AUSWERTUNG

Färberisch nachweisbare Proteinbanden wurden durch ihre relativen Mobilitäten (R_f -Wert, siehe 2.2.3.2.) be-

schrieben. Bezugspunkt für die Berechnung der R_f -Werte war das anodale Gelende.

Die Molekulargewichte der färberisch nachweisbaren Probenbestandteile wurden im Vergleich mit dem elektrophoretischen Verhalten von Referenzproteinen bestimmt. Hierzu wurden in einer Eichkurve die Logarithmen der bekannten Molekulargewichte der Referenzsubstanzen gegen deren R_f -Werte aufgetragen (Abb.7).

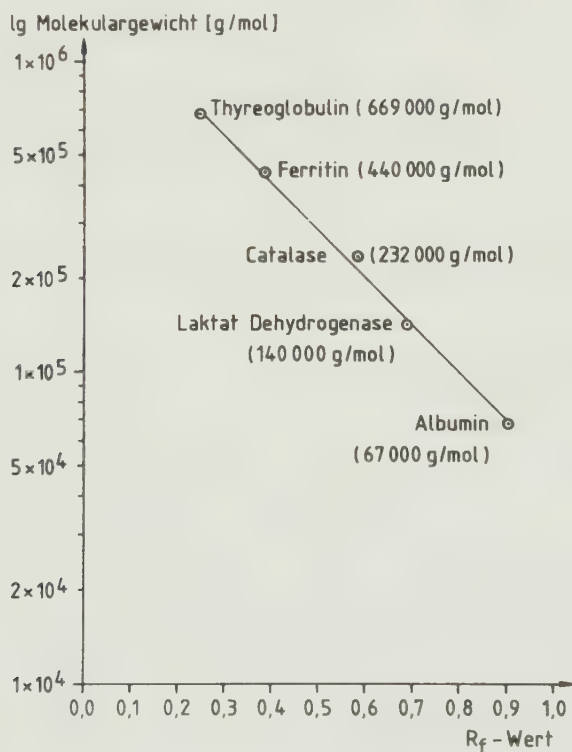


Abb.7: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung nativer Proteine mittels Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gradientengelen

2.2.4. Isoelektrische Fokussierung in 500 μ m Agarose-Dünnschichtgelen

Theoretische Grundlagen

Das große Interesse an der isoelektrischen Fokussierung beruht auf ihrem hohen Auflösungsvermögen, vor allem aber darauf, daß sie Proteine durch ihren isoelektrischen Punkt, eine hochempfindliche, physikochemische Konstante, charakterisiert. Die besondere Bedeutung dieser physikochemischen Konstanten liegt darin, daß sie abhängig ist von Unterschieden der Primärstruktur, die auf genetischer Ebene beruhen oder im Rahmen von Biosynthese und Biodegradation entstehen können (8,60, 63,141).

Die Grundprinzipien der isoelektrischen Fokussierung wurden bereits 1929 von Williams und Waterman (142) beschrieben. Jedoch erst seit den Jahren 1954 - 1956 entwickelte sich ein zunehmendes Interesse an dieser Sonderform der elektrophoretischen Technik: H.Svensson (seit 1968 H.Rilbe) beschrieb die theoretischen, mathematischen Grundlagen dafür, welche physikalischen und chemischen Eigenschaften Substanzen besitzen müssen, um mit ihnen im elektrischen Feld einen linearen pH-Gradienten aufzubauen, und um in diesem pH-Gradienten geeignete Bedingungen für eine gute elektrophoretische Auftrennung zu ermöglichen (123,124,125,131). O.Vestberg gelang es, mit den sogenannten Trägerampholyten, amphoteren Polyaminopolycarboxysäuren, die er durch Synthese von aliphatischen Polyaminen mit Carboxylsäureresten gewonnen hatte, die von H.Svensson für den

Aufbau eines linearen pH-Gradienten im elektrischen Feld und gute elektrophoretische Trennbedingungen theoretisch geforderten Substanzen herzustellen (132). Bis heute erfuhr die isoelektrische Fokussierung eine stetige Verfeinerung der Technik und Erweiterung ihres Anwendungsbereiches (49,50,61,101,103).

Voraussetzung für die Bewertung der Auftrennung von Einzelsubstanzen durch isoelektrische Fokussierung ist es, die Reinheit der untersuchten Probe z.B. durch Disc-Elektrophorese nachzuweisen.

DIE TRÄGERAMPHOLYTE

Ein pH-Gradient entsteht im elektrischen Feld bereits durch anodale Oxidation und kathodale Reduktion:

anodale Reaktion: $6 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow \text{O}_2 + 4 \text{ H}_3\text{O}^+ + 4 \text{ e}^-;$

kathodale Reaktion: $4 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ e}^- \longrightarrow 2 \text{ H}_2 + 4 \text{ OH}^-;$

Dieser pH-Gradient besitzt jedoch keinerlei Pufferkapazität und würde durch die Pufferkapazität der aufzutrennenden Proteine zerstört werden. Um einen stabilen pH-Gradienten zu erhalten, werden deshalb die Trägerampholyte benötigt. Trägerampholyte sind amphotere Substanzen, die durch Koppelung von Carboxylsäureresten mit Polyethylen-Polyaminen der allgemeinen Formel $(\text{R})_2\text{-N-(CH}_2)_n\text{-N-(R)}_2$ (R gleich H oder gleich $-(\text{CH}_2)_n\text{-N-(R)}_2$, und n gleich 2 - 4), bzw. durch Polymerisation von Aminen mit Epichlorhydrin entstehen (132,133).

Die Trägerampholyte erfüllen eine Reihe wichtiger Eigenschaften:

1. Die Dissoziationskonstanten der sauren und basischen Gruppen der Trägerampholyte liegen nahe beisammen. Damit besitzen die Trägerampholyte schmale isoionische bzw. isoprotische Punkte (108). Dies ist Voraussetzung für eine ausreichende elektrische Leitfähigkeit und eine gute Pufferkapazität am isoelektrischen Punkt (108,124). Die ausreichende elektrische Leitfähigkeit ermöglicht gute elektrophoretische Trennbedingungen. Die gute Pufferkapazität läßt die Trägerampholyte auch bei hoher Probenkonzentration den pH-Wert bestimmen, d.h. der pH-Gradient ist stabil.
2. Es können sehr viele verschiedene Trägerampholyte mit isoelektrischem Punkt im Bereich von pH 2,5 - 11,0 synthetisiert werden. (Der isoelektrische Punkt der meisten Proteine liegt im Bereich von pH 3,0 - 10,0.) Dabei unterscheidet sich der isoelektrische Punkt der einzelnen Trägerampholyte um weniger als 0,05 pH-Einheiten, was Voraussetzung für den Aufbau eines linearen pH-Gradienten und ein gutes Auflösungsvermögen ist (133). Gleichzeitig besitzen alle diese Trägerampholyte an ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt eine ähnliche elektrische Leitfähigkeit. Dies ist wichtig, damit im pH-Gradienten nicht Zonen niedriger neben solchen hoher elektrischer Leitfähigkeit entstehen. Denn Zonen niedriger elektrischer Leitfähigkeit wären mit hohem Spannungsabfall und somit stärkerer Wärmeentwicklung und der Gefahr der Proteindenaturierung verbunden. Zonen höherer elektrischer Leitfähigkeit besitzen folglich nur noch einen geringeren Spannungsabfall, verbunden mit einem schlechten Auflösungsvermögen (133).

3. Trägerampholyte sind gut wasserlöslich. Sie verhalten sich gegenüber Proben chemisch inert. Eventuelle Wechselwirkungen mit Proben sind aufgrund der überwiegend hydrophilen Eigenschaften der Trägerampholyte unspezifischer und reversibler Natur. Vielmehr üben Trägerampholyte auf labile und schwer lösliche Proben stabilisierend und solubilisierend (133).
4. Trägerampholyte besitzen ein niedriges Molekulargewicht um 800 g/mol. Sie wandern damit im elektrischen Feld in der Regel schneller als die Proben und bauen den pH-Gradienten in kurzer Zeit auf. Das niedrige Molekulargewicht der Trägerampholyte ermöglicht deren einfache Trennung von den Proben durch z.B. Dialyse oder Gelchromatographie (133).
5. Trägerampholyte besitzen eine niedrige und über das pH-Spektrum gleichmäßige Absorption unter 0,05 bei 280 nm (133). Damit ist ein Proteinnachweis nach Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung mittels Densitometrie im UV-Licht bei 280 nm möglich.

Durch anodale Oxidation und kathodale Reduktion entsteht an der Anode ein saures und an der Kathode ein alkalisches Milieu (s.o.). Um den pH-Wert an den beiden Extremen des pH-Gradienten zu stabilisieren, ist die Anwendung von Elektrodenlösungen erforderlich: eine verdünnte Säure für die Anode und eine verdünnte Base für die Kathode. Die jeweiligen Elektrodenlösungen sollten etwa den pH-Wert besitzen, der den pH-Gradienten begrenzt.

DIE TRÄGERMEDIEN

Neben dem Aufbau eines linearen pH-Gradienten kommt bei der isoelektrischen Fokussierung den **Trägermedien** eine sehr wichtige Funktion zu. Die **Trägermedien** haben vor allem Einfluß auf das Auflösungsvermögen einer isoelektrischen Fokussierung, auf die Art der auftrennbaren Proben, auf die Art und die Sensitivität des Probenachweises, sowie die Dauer, den Schwierigkeitsgrad der Durchführung und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer isoelektrischen Fokussierung. Von einem für die isoelektrische Fokussierung geeigneten Trägermedium sind zu fordern, daß es ausreichende mechanische Stabilität besitzt, daß es die Diffusion von Trägerampholyten und Proben weitgehend einschränkt (Funktion des Antikonvektionsmediums), und daß es sich gegenüber Proben chemisch inert verhält. Das "Maschenwerk" eines Trägermediums muß ausreichend weit sein, um den Probesubstanzen eine ungehinderte Beweglichkeit zu ermöglichen. Ferner ist von großer Bedeutung, daß die Matrix des Trägermediums weitgehend frei von Ladungen ist. Dies ist deshalb so wichtig, damit keine Ionenaustauschereffekte auftreten, damit das Trägermedium den Kräften des elektrischen Feldes standhält, die bei der isoelektrischen Fokussierung bei Spannungen von 100 - 300 V/cm Elektrodendistanz relativ groß sind, und damit keine stärkere **elektrische Endosmose (EEO)** auftritt. Bei der **elektrischen Endosmose** handelt es sich um Flüssigkeitsbewegungen im Trägermedium, die im elektrischen Feld auftreten (23,91). Diese Flüssigkeitsbewegungen bewirken, daß Teile des Trägermediums austrocknen, eventuell sogar zerreißen, während andere Teile überflutet werden. Als Ursache der elektrischen Endosmose wird angenommen, daß durch die elektrischen Ladungen des Trägermediums im angrenzenden Flüssigkeitsfilm ent-

gegengesetzte Ladungen induziert werden. Dieser Flüssigkeitsfilm wird dann im elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode bewegt. Da die elektrischen Ladungen des Trägermediums meist negativ sind, überwiegt eine Flüssigkeitsbewegung zur Kathode. Folgen der elektrischen Endosmose sind eine Drift und eine Abflachung des pH-Gradienten, in der Regel zur Kathode, eine schlechte Auflösung und wellenförmig verzerrte Probenbanden. Daneben treten Flüssigkeitsansammlungen im neutralen Bereich des pH-Gradienten auf. Als deren Ursache wird der amphotere Charakter des im Trägermedium enthaltenen Wassers diskutiert (23). Hydronium- und Hydroxyl-Ionen werden im pH-Gradienten und elektrischen Feld zu ihrem isoelektrischen Punkt wandern und dort eine Flüssigkeitsansammlung verursachen. Die Art des auftretenden Flüssigkeitsstromes variiert mit dem jeweiligen verwendeten pH-Gradienten (23). Durch Einbringung von Additiven wie Glycerol, Sorbitol oder Saccharose in das Trägermedium gelingt es, die Flüssigkeitsbewegungen erheblich zu reduzieren. Diese Additive bewirken vermutlich über eine Erhöhung der Osmolarität und der Viskosität der im Trägermedium enthaltenen Flüssigkeit eine Verlangsamung der Flüssigkeitsströme (23).

Als **Trägermedien** zur isoelektrischen Fokussierung in horizontalen Elektrophoresesystemen finden heute vor allem Polyacrylamid-, Agarose- und granuliert-Flachbett-Gele Anwendung.

Granulierte Gele, aus über Epichlorhydrin quervernetztem Dextran aufgebaut, finden nur noch für die präparative Auftrennung größerer Probenmengen Anwendung (102).

Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und Vernetzung mit dem Komonomer N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis). Polyacrylamidgele besitzen eine weitgehend ungeladene Matrix. Damit tritt nur eine geringfügige elektrische Endosmose auf, der pH-Gradient ist stabil, hohe Spannungen sind anwendbar und die Auflösung ist folglich sehr gut (49,50,103). Ein weiterer Vorteil von Polyacrylamidgelen liegt darin, daß ihre "Porengröße" der Molekülgröße der Probe angepaßt werden kann. Polyacrylamidgele werden vor allem zu analytischen Zwecken verwendet. Als Nachteile von Polyacrylamidgelen lassen sich anführen, daß sie nur für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 5×10^5 g/mol verwendbar sind, daß Artefakte durch Reaktion von freier Acrylsäure und dem Katalysator Ammoniumpersulfat mit der Probe möglich sind (16), daß Färben und Entfärben langwierig sind und der Gelhintergrund nie ganz klar wird, sowie daß Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid Neurotoxine sind (139).

Agarose ist ein Polysaccharid, das sich chemisch aus alternierenden Sequenzen von 1,3 verknüpften β -D-Galaktopyranose- und 1,4 verknüpften 3,6 anhydro α -L-Galaktopyranose-Resten zusammensetzt (6,31,55,104). Mit Agarosegelen können Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 2×10^6 g/mol aufgetrennt werden, die Gelherstellung ist schnell und einfach, isoelektrische Fokussierung, Färben und Entfärben benötigen wenig Zeit (134). Stets ist ein völlig klarer Gelhintergrund zu gewinnen, was von großem Wert für eine densitometrische Auswertung ist. Agarosegele besitzen neben analytischen und präparativen Verwendungszwecken noch ein weites Anwendungsgebiet, z.B. für Zymogramntechniken, also den Nachweis von Enzymen mit Farbe entwickelnden Substratlösungen (136), für die Immunfixierung (21,109), Auto-

radiographie, gekreuzte, immunisoelektrische Fokussierung (61) u.a.. Hauptproblem bei der isoelektrischen Fokussierung in Agarosegelen ist, daß die Matrix von Agarosegelen relativ viele elektrische Ladungen trägt. Somit treten mit elektrischer Endosmose (s.o.) verbundene Schwierigkeiten auf (61). Diese Probleme sind mittlerweile jedoch mit speziell für die isoelektrische Fokussierung hergestellter, hochgereinigter Agarose und dem Einbringen von Sorbitol in das Gel (s.o.) gut zu beherrschen.

Aufgrund der direkten Proportionalität von während einer isoelektrischen Fokussierung anwendbarer Spannung und dem zu erzielenden Auflösungsvermögen besteht bei den **Trägermedien** für die isoelektrische Fokussierung zur Zeit der Trend, immer dünnere Flachbettgele zu verwenden. Im Verlauf einer isoelektrischen Fokussierung nimmt mit sich aufbauendem pH-Gradienten die Konduktivität im Trägermedium ab, konsekutiv verringert sich die Stromstärke und steigt die Spannung. Die höchsten Spannungen von etwa 300 V/cm Elektrodendistanz lassen sich infolge besserer Kühlfähigkeit mit ultradünnen Polyacrylamidgelen im mittleren pH-Bereich von pH 4 - 8 erzielen. Ultradünne Gele bieten als weitere Vorteile Materialeinsparung, geringere Probemengen, kürzere Zeiten für die isoelektrische Fokussierung, für Färben und Entfärben. Grenzen sind der Geldicke aus Gründen der mechanischen Stabilität und der Stabilität des pH-Gradienten gesetzt. Als untere Grenze der Geldicke gelten zur Zeit 250 - 500 μm (49,50,101,103).

Praktische Durchführung

BENÖTIGTE LÖSUNGEN

Elektrodenlösungen:

- für die Anode 0,5 M Essigsäure pH 2,5
- für die Kathode 0,5 M NaOH pH 13,5

Die Lösungen sind bei Raumtemperatur für mehrere Monate stabil (pH kontrollieren).

Fixierlösung:

- Trichloressigsäure 10 g/dl
- Sulfosalicylsäure 1 g/dl

Die Lösung ist mehrfach verwendbar. Sie wurde jeweils vor Gebrauch filtriert.

Färbelösung:

- 0,1 g/dl Serva Violett 17 in Entfärbelösung
Der Farbstoff wird zunächst in 96%igem Methanol oder 96%igem Äthanol unter Rühren für ca. 5 min gelöst. Dann werden 96%ige Essigsäure und aqua dest. zugegeben.

Die Färbelösung ist mehrfach verwendbar, bis längere Färbezeiten erforderlich werden. Die Färbelösung wurde vor jedem Gebrauch gefiltert, um ausgefallene Farbpartikel zu entfernen.

Entfärbelösung:

- 7 Volumenteile Methanol (oder Äthanol) (je 96%ig)
- 2 Volumenteile Essigsäure (96%ig)
- 11 Volumenteile aqua dest.

Die Entfärbelösung wurde nach Gebrauch über eine Aktivkohlesäule geleitet, bis sie klar und wiederverwendbar war.

Detergenzlösung:

- 0,1 Vol. % Triton X-100 in aqua dest.

HERSTELLUNG DER AGAROSE-DÜNNSCHICHTGELE

Agarose-Dünnschichtgele für die isoelektrische Fokussierung wurden nach Kapillartechnik mittels einer wie in Abb.8A dargestellten Gießform im Format 24,0 x 11,5 x x 0,05 cm hergestellt. Gießform und eine 20 ml Spritze zum Gießen wurden in einem Wärmeschränk auf + 60 - + 70 °C temperiert, um ein vorzeitiges Erstarren des Gelsols während des Gießvorganges zu verhindern.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 180 mg Agarose IEF ($\approx$ 1 Gewichtsprozent) und 2,2 g D-(-)-Sorbitol ($\approx$ 12 Gewichtsprozent) in 16,6 ml aqua dest. suspendiert und in einem Wasserbad auf + 100 °C erhitzt bis ein klares Gelsol entstand. Nach Abkühlung dieses Gelsols auf + 75 °C wurden 1,4 ml Ampholine für die Bereiche pH 4,0 - 6,5 bzw. pH 3,5 - 9,5 zugegeben. Verdunstetes aqua dest. wurde ersetzt. Nun wurden Gießform und Spritze aus dem Wärmeschränk entnommen, die Gießform etwa 5° geneigt gelagert, das Gelsol mit der Spritze aufgenommen und wie in Abb.8B dargestellt in die Gießform gegossen. Durch Kapillar- und Schwerkraft saugte sich das Gelsol in die Gießform. Sobald das Gelsol das untere Ende der Gießform erreicht hatte, wurde diese für etwa 20 min horizontal gelagert bis das Gel erstarrt war. Dann wurde das auf der Trägerfolie haftende Gel aus der Gießform entnommen und gewogen. Ein frisch gegossenes Agarose-Kapillargel besaß mit Trägerfolie ein Gewicht von 23 - 24 g. Zu vollständigem Erhärten wurde ein Agarosegel für mindestens 1 h bei

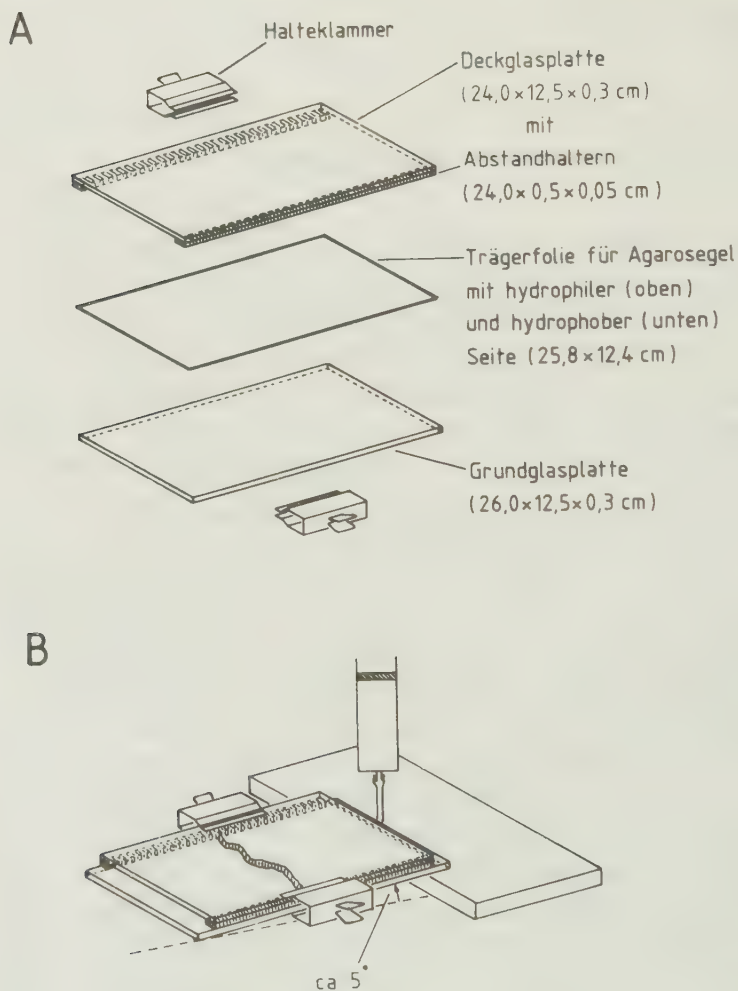


Abb. 8:

- A:** Aufbau der Gießform zur Herstellung von $500\ \mu\text{m}$ Agarose-Dünnschichtgelen für die isoelektrische Fokussierung
- B:** Gießen eines Agarose-Dünnschichtgels für die isoelektrische Fokussierung

+ 4 °C in einer Feuchtekammer gelagert. So aufbewahrt waren die Gele noch nach zwei Wochen verwendbar.

Vor einer isoelektrischen Fokussierung wurde das bei + 4 °C in einer Feuchtekammer gelagerte Agarosegel erneut gewogen und in einem Wärmeschränk bei ca. + 50 °C (für etwa 10 min) auf ein Gewicht von ca. 22 g gebracht. Wie eigene Versuche gezeigt haben besaß das Gel damit einen Flüssigkeitsgehalt, bei dem die Auswirkungen der elektrischen Endosmose weiter reduziert werden konnten. Ein niedrigerer Wassergehalt bewirkte einen höheren elektrischen Widerstand im Gel, damit einen initial höheren Spannungsabfall über das Gel mit der Gefahr starker Wärmeentwicklung, Proteindenaturierung und Gelzerstörung. Dagegen standen bei höherem Wassergehalt die Probleme der elektrischen Endosmose (s.o.) im Vordergrund. Beides, zu hoher und zu niedriger Wassergehalt des Agarosegels hatten schlechtere Trennergebnisse zur Folge.

PROBENBEREITUNG

Zum direkten färberischen Nachweis mit Coomassie Brilliant Blue wurde gereinigtes, salzfreies und gefriergetrocknetes Protein zu einer Konzentration von 2 - 5 µg/µl gelöst. Proteinlösungen wurden zu entsprechender Konzentration verdünnt. Als Lösungsmittel bzw. zur Verdünnung wurde 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet. Für das Lösungsmittel wurde eine Molarität ≥ 50 mM gewählt und stark puffernde Salze wie Tris gemieden, um den pH-Gradienten der isoelektrischen Fokussierung nicht zu beeinflussen. NaCl bewirkte in eigenen Versuchen bis zu einer Konzentration von 0,5 M keine Störung des pH-Gradienten.

vorbereiteten (s.o.) Agarosegels aufgetragen. Bei der Probenauftragung wurde darauf geachtet, daß die Abstände zwischen den einzelnen Proben klein waren (ca. 2 - 4 mm), daß die Proteinkonzentrationen benachbarter Proben sich um nicht mehr als den Faktor 10 unterschieden, sowie daß Salzkonzentrationen und pH-Werte benachbarter Proben ähnlich waren. Die Beachtung dieser Punkte trug dazu bei, daß keine Verzerrungen des pH-Gradienten und damit keine wellenförmig verzerrten Proteinbanden auftraten, was bei der Bestimmung der isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden Probleme bereitet hätte.

Isoelektrische Fokussierung wurde unter Temperierung auf + 18 °C bei einer Leistung von 0,625 W/cm Gellänge durchgeführt. Bei einer Elektrodendistanz von 10 cm wurden dabei die Spannung auf maximal 150 V/cm Elektrodendistanz und die Stromstärke auf maximal 1,25 mA (pH 4,0 - 6,5) bzw. 1,70 mA (pH 3,5 - 9,5) pro cm Gellänge begrenzt. Die Dauer einer isoelektrischen Fokussierung betrug 90 min (pH 4,0 - 6,5) bzw. 60 min (pH 3,5 - 9,5). Alle 30 min wurden Leistung, Spannung und Stromstärke kontrolliert, sowie unter kurzer Unterbrechung der isoelektrischen Fokussierung eventuell an der Kathode angesammeltes Wasser mit einem Filterpapier entfernt.

Unter den angegebenen Bedingungen entwickelte sich bei konstanter Leistung für Stromstärke und Spannung ein charakteristischer Verlauf (Abb.10A und B).

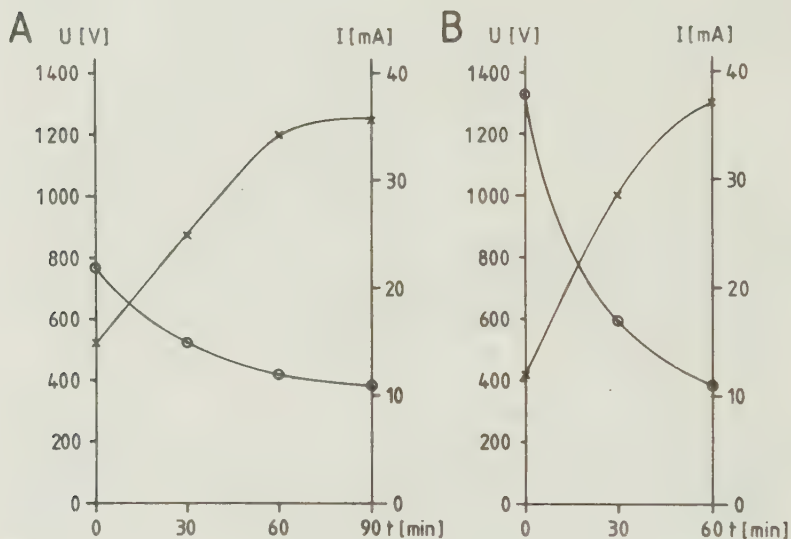


Abb.10A und B: Verlauf von Stromstärke und Spannung während einer IEF im pH-Bereich von **A:** pH 4,0 - 6,5, **B:** pH 3,5 - 9,5 bei einer konstanten Leistung von 0,625 W/cm Gellänge in einem Agarosegel von 22 g (24,0 x 11,5 x 0,05 cm, mit Trägerfolie)

ANFÄRBen DER PROTEINBANDEN

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurde das Agarosegel entlang der Innenränder der Elektrodenstreifen mit einem Skalpell durchtrennt, die Elektrodenstreifen entfernt, und das abgetrennte Gel mit einem Spatel abgekratzt. Dieses Vorgehen erwies sich als vorteilhaft, um eine Verzerrung des pH-Gradienten durch die pH-Extreme der Ränder zu vermeiden. Ferner waren damit klare Bezugspunkte für die Erstellung einer Eichkurve (s.u.) geschaffen. Das auf der Trägerfolie haftende Agarosegel wurde nun für mindestens 10 min in Fixierlösung gelegt. Anschließend wurde es aus der Fixierlösung genommen, mit einem feuchten, vier trockenen Filterpapieren und einer Glasplatte überschichtet, mit 1 - 2 kg beschwert und für ca. 10 min gepreßt. Das Agarosegel wurde dann mit einem Fön zu einem dünnen Film getrocknet und dann für ca. 10 min in Färbelösung gelegt. Entfärbt wurde das Agarosegel unter 1 - 2 maligem Wechsel der Entfärbelösung bis der Gelhintergrund klar war. Erneut wurde das Agarosegel mit einem Fön getrocknet. Zu Dokumentationszwecken konnte das gefärbte und auf der Trägerfolie haftende Agarosegel unbegrenzt aufbewahrt werden.

AUSWERTUNG

Nach Probenauftrennung durch isoelektrische Fokussierung färbereich nachweisbare Proteinbanden wurden durch ihren isoelektrischen Punkt (pI) beschrieben. Hierzu wurde anhand mitaufgetrennter Referenzproteine eine Eichkurve erstellt. Die Eichkurve beschrieb die Abhängigkeit des pH-Wertes im Gel von der Distanz zu einer Elektrode, in der Regel zur Anode (Abb.11).

Teilweise bestand die Möglichkeit, die gefärbten Agarosegele mit einem Laserdensitometer (Ultro Scan, LKB 2202-002) auszuwerten. Über einen angeschlossenen Rechner konnten die Flächen unter der erhaltenen Absorptionskurve integriert und die prozentualen Anteile der einzelnen Proteinpeaks an der Gesamtfläche berechnet werden.

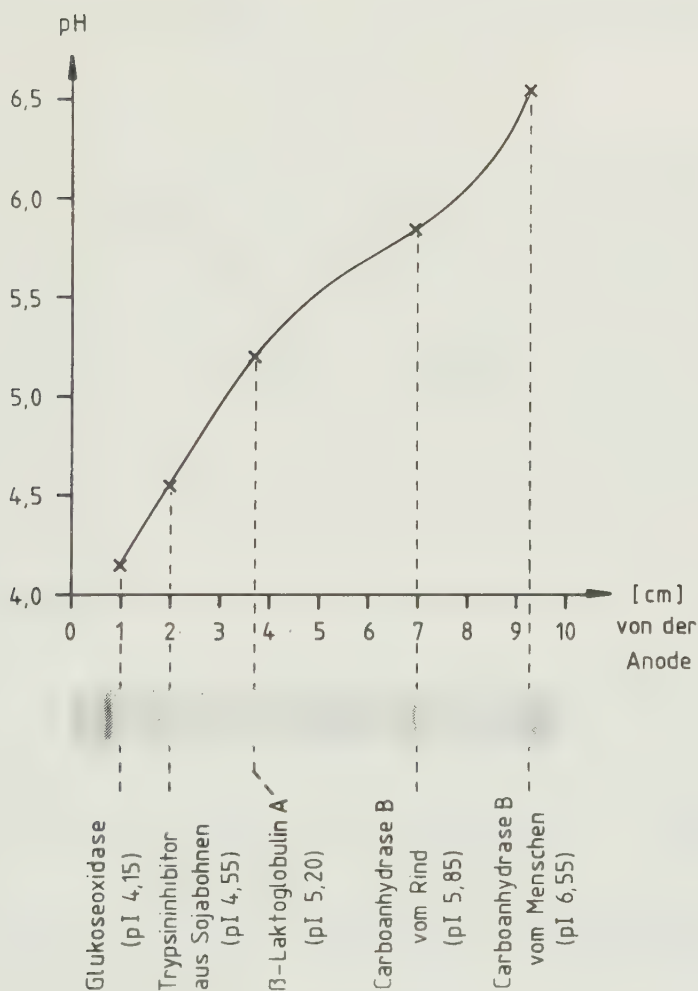


Abb.11: Bandenmuster der Referenzproteine des "Low-pI-Calibration Kit" der Firma Pharmacia nach IEF im Bereich von pH 4,0 - 6,5 und hieraus erstellte Eichkurve zur Bestimmung der pI-Werte aufgetrennter Proben

2.2.5. Bestimmung des N-Acetyl-Neuraminsäuregehaltes von humanem Thyreoglobulin

Humanes 19S Thyreoglobulin trägt in seinen 22 B Kohlenhydratketten endständig N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA) (52,71,90). Diese N-Acetyl-Neuraminsäurereste wurden enzymatisch mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (EC. 3.2.1.18) abgespalten, der N-Acetyl-Neuraminsäuregehalt von Thyreoglobulin vor und nach enzymatischer Desialisierung gemessen, sowie das desialisierte Thyreoglobulin durch isoelektrische Fokussierung charakterisiert.

2.2.5.1. Enzymatische Desialisierung von Thyreoglobulin

Zur Desialisierung wurde gefriergetrocknetes Thyreoglobulin in 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 5,5 mit 154 mM NaCl und 9 mM CaCl_2 zu einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Zu je 100 μl der Thyreoglobulinlösung wurden 20 μl Neuraminidaselösung zugegeben und für 24 h bei + 37 °C in einem Wärmebad inkubiert.

Das desialisierte Thyreoglobulin wurde chromatographisch über ACA 22 Ultrogel gereinigt, die Thyreoglobulinfraktion durch Vakuumdialyse mit Kollodiumhülsen gegen 0,05 M Ammoniumacetat konzentriert und gefriergetrocknet.

2.2.5.2. Bestimmung von N-Acetyl-Neuraminsäurekonzentrationen

Theoretische Grundlagen

Der N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA)-Gehalt von gereinigtem, humanem Thyreoglobulin wurde mit dem Thiobarbitursäure-Assay für Sialinsäuren nach L. Warren (137) bestimmt. Da der Thiobarbitursäure-Assay nur freie Sialinsäuren mißt, wurden Thyreoglobulinlösungen zunächst bei + 80 °C für 1 Stunde in 0,1 n H_2SO_4 erhitzt. Hierdurch wurden die in den B-Kohlenhydratketten des Thyreoglobulinmoleküls endständig enthaltenen NANA-Reste (52) ohne chemische Degradation (137) freigesetzt. Der Assay bestand dann aus folgenden Schritten:

PERJODAT-OXIDATION IN 9 M H_3PO_4 :

Das saure Milieu ist erforderlich, um einen maximalen, molaren Extinktionskoeffizienten zu erhalten, evtl. auch, um die Substituenten (Acetyl- oder Glycolylreste) der Aminogruppe des Sialinsäuremoleküls abzuspalten. Als Produkt der Perjodatoxidation entsteht β -Formyl-Pyruvat. Die spätere Farbentwicklung ist optimal, wenn Perjodat in einer Konzentration von 0,2 - 0,4 M eingesetzt wird, und wenn die Oxidation bei Raumtemperatur (+ 22 °C) erfolgt.

NATRIUM-ARSENIT-SCHRITT:

Natrium-Arsenit zerstört das Perjodat und beendet damit die Oxidationsreaktion.

THIOBARBITURSÄURE-SCHRITT:

Thiobarbitursäure reagiert mit β -Formyl-Pyruvat, dem Produkt der Perjodat-Oxidation, bei Inkubation im kochenden Wasserbad unter Bildung eines Chromophoren. Die Farbentwicklung steigt mit der Dauer der Inkubation und erreicht nach ca. 13 Minuten ihr Maximum.

EXTRAKTION IN EIN ORGANISCHES LÖSUNGSMITTEL:

Der Chromophor wird in Cyclohexanon extrahiert, da hierbei eine Steigerung der Farbintensität erfolgt. Das im Thiobarbitursäurereagenz enthaltene Natriumsulfat vermindert zwar die Farbentwicklung in der wässrigen Phase, erleichtert und steigert aber die Extraktion des Chromophoren in die organische Phase, und trägt damit zur Vergrößerung des molaren Extinktionskoeffizienten bei.

PHOTOMETRISCHE MESSUNG:

Der gebildete Chromophor besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 549 \text{ nm}$, der molare Extinktionskoeffizient ist $\epsilon = 57\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Farbe ist in saurer wässriger Lösung und in Cyclohexanon stabil. Die optische Dichte bleibt für mehrere Stunden stabil. Die Berechnung der Sialinsäurekonzentration der Probe erfolgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{E_{549 \text{ nm}} \cdot V}{\epsilon \cdot d} \text{ M}$$

mit: c: NANA-Konzentration der eingesetzten Probe
in [M] ;
E: gemessene Absorption bei $\lambda = 549 \text{ nm}$;
 ϵ : molarer Extinktionskoeffizient:
 $57\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;
d: Dicke der Meßküvette: 1 cm;
V: Verdünnungsfaktor: 21,5;

Es ergibt sich ein linearer Meßbereich für eine Probenkonzentration von 50 - 300 μM NANA.

SPEZIFITÄT:

Glukosamin, N-Acetyl-Glukosamin, Mannosamin, N-Acetyl-Mannosamin, Galaktosamin, N-Acetyl-Galaktosamin, Glukose, Fruktose, Galaktose, L-Fukose, d-Mannose, D-Ribose, Galakturonsäure, Diphosphopyridin-Nukleotide, ATP, Aspartat, Histidin, Glutamat, Folsäure und Uridin-5'Monophosphat führen im Assay zu keiner Farbentwicklung und interferieren nicht mit der Farbentwicklung aus N-Acetyl-Neuraminsäure, ausgenommen L-Fukose, das zu einer 35%igen Abnahme der optischen Dichte führt.

2-Desoxyribose bildet im Assay einen Chromophoren mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 532 \text{ nm}$, der auch zur Absorption bei $\lambda = 549 \text{ nm}$ erheblich beiträgt. Enthält die Probe 2-Desoxyribose, sind Korrekturen erforderlich und möglich (137).

Praktische Durchführung**BENÖTIGTE LÖSUNGEN**

Natriumperjodat-Lösung (0,2 M in 9 M H_3PO_4):

- NaIO_4 21,4 g
- H_3PO_4 (87%ig) 303,4 ml
- ad 500 ml aqua dest.

Natrium-Arsenit-Lösung (10%ig):

- NaAsO_2 100 g
- 1 n H_2SO_4 100 ml
- Na_2SO_4 ($\hat{=}$ 0,5 M) 71,1 g
- ad 1 000 ml aqua dest.

Thiobarbitursäure-Lösung (0,6 g%):

- Thiobarbitursäure 6,0 g
- Na_2SO_4 ($\hat{=}$ 0,5 M) 71,1 g
- ad 1 000 ml aqua dest.

Perjodat-, Arsenit- und Thiobarbitursäure-Lösung wurden unter Erwärmen zubereitet. Sie waren bei Raumtemperatur für mehrere Monate haltbar.

Standardlösungen:

0 - 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200 $\mu\text{g/ml}$ NANA
(= 0 - 40 - 81 - 162 - 323 - 647 μM NANA)
in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4

Probelösungen:

a) gereinigtes, humanes Thyreoglobulin

7,5 - 5,6 - 3,8 - 1,9 mg/ml Tg

11,4 - 8,5 - 5,8 - 2,9 μM Tg

b) gereinigtes, humanes, desialisiertes Thyreoglobulin

7,0 - 3,5 mg/ml Tg

10,6 - 5,3 μM Tg

jeweils gelöst in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4

INKUBATIONSANSATZ UND PHOTOMETRISCHE MESSUNG

- 50 μ l Probe bzw. Standard
+ 6 μ l 1 n H_2SO_4 ($\rightarrow$ Probe in 0,1 n H_2SO_4)
-

Inkubation im Wasserbad bei + 80 °C für 1 Stunde
(Abspaltung von NANA vom Thyreoglobulinmolekül)

- nach Abkühlung auf Raumtemperatur:
+ 25 μ l 0,2 M Natriumperjodat in 9 M H_3PO_4
schütteln und Inkubation bei Raumtemperatur für
20 Minuten
-

- + 250 μ l 10%ige Natrium-Arsenit-Lösung
schütteln bis die gelbbraune Farbe verschwindet
+ 750 μ l 0,6%ige Thiobarbitursäurelösung
Inkubation in kochendem Wasserbad für mindestens
15 Minuten
-

Gefäße 5 Minuten in Eiswasser stellen bis die rote
Farbe verblaßt

- + 1 075 μ l Cyclohexanon (Extraktion des Chromophoren)
2 mal mit Vortex kräftig schütteln
-

3 Minuten bei 600 g Zentrifugieren

organische Phase mit einer Pasteurpipette abheben

photometrische Messung bei $\lambda = 549 \text{ nm}$

Wegen der Extraktion mit Cyclohexanon wurde der Assay
in Glasgefäßen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in
Doppelwerten.

Die N-Acetyl-Neuraminsäure-Konzentrationen der Proben wurden anhand der erstellten Eichkurve (Abb.12), sowie rechnerisch nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt.

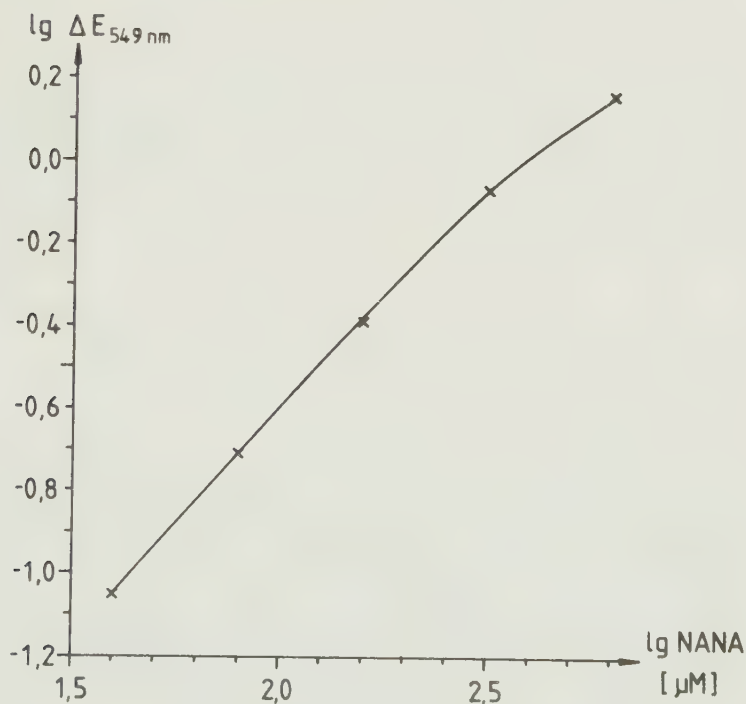


Abb.12: Standard Eichkurve zur Bestimmung von N-Acetyl-Neuraminsäure mit dem Thiobarbitursäure-Assay für Sialinsäuren nach L.Warren

2.2.6. Chemische Gesamtjodbestimmung nach der
Cer-Arsenit-Methode mittels
Technicon-Autoanalyzer

Theoretische Grundlagen

Die Methode nach Sandell und Kolthoff (1937) (115) zur Messung geringer Mengen anorganischen Jods beruht vermutlich auf einer pseudokatalytischen Wirkung des Jodids auf die Reduktion von Ce^{4+} durch As^{3+} in verdünnter Schwefelsäure, wie sie erstmals 1955 von Dubravcic (29,30) formuliert wurde:



Ist As^{3+} in etwa zwanzigfachem Überschuß gegenüber Ce^{4+} vorhanden, und ist die Konzentration von As^{3+} und Ce^{4+} gegenüber dem zu messenden I^- hoch, so ist die Geschwindigkeit der Reduktion der intensiv gelb gefärbten Ce^{4+} - zur farblosen Ce^{3+} - Lösung proportional der I^- - Konzentration (112,122). Das Absorptionsmaximum des im schwefelsauren Milieu als $\text{H}_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_3$ - Komplex vorliegenden Ce^{4+} liegt bei 317 nm und kann photometrisch gemessen werden (112,122). Um eine Oxidation des I^- durch Ce^{4+} bis zum Jodat zu vermeiden, das nur eine geringe katalytische Wirkung auf die Cer-Arsenit-Reaktion hat, werden der Arsenlösung Cl^- - Ionen zugefügt, die mit Jod Verbindungen wie I_2Cl^- , HICl_2 und ICl eingehen (112).

Um organisch gebundenes Jod mit dieser Reaktion messen zu können, wird das organische Material durch Erhitzen in konzentrierter Schwefelsäure in Gegenwart eines oxidierenden Säuregemisches aus konzentrierter Salpeter- und konzentrierter Perchlorsäure verascht. Jodid wird hierdurch freigesetzt (14,112).

Praktische Durchführung

BENÖTIGTE LÖSUNGEN:

Arsenlösung:

- 19,6 g As_2O_3 in 300 ml sterilen aqua dest. suspendieren;
- unter Rühren bis zum Sieden erhitzen (auf beheizbarem Magnetrührer bei ca. + 200 °C);
- 100 ml 25%ige Ammoniaklösung zugeben;
- rühren bis die Lösung vollkommen klar ist;
- etwas Phenolphthaleinlösung zugeben, bis sich die Lösung leicht rosa färbt (ca. 100 µl);
- konzentrierte Schwefelsäure zugeben, bis sich die Lösung entfärbt (20 - 22 ml);
- 56 ml konzentrierte Schwefelsäure zugeben;
- 50 g NH_4Cl zugeben und bis zur Lösung rühren;
- mit sterilem aqua dest. auf 2 000 ml auffüllen;

Ammonium-Cer(IV)-Sulfat-Lösung:

- 20 g $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 200 ml sterilen aqua dest. suspendieren;
- 52 ml konzentrierte Schwefelsäure zugeben: die Lösung erhitzt sich und wird unter fließendem Wasser gekühlt;
- bis zur vollständigen Lösung schütteln (eventuell filtrieren);
- auf 1 000 ml mit sterilem aqua dest. auffüllen;
- die Lösung wird in vor Licht schützenden Kunststoffflaschen oder in dunklen Glasgefäßen aufbewahrt;

Veraschungsgemisch

- 100 ml etwa 65%ige Salpetersäure;
- 400 ml etwa 70%ige Perchlorsäure;
- (die Lösung wird jeden (2.) Tag frisch bereitet);

Brij-Lösung

- (für Probennehmer zum Spülen zwischen den Proben (Abb.13), sowie zur Verdünnung der veraschten Probe am Ausgang der Veraschungshelix (Abb.14));
- 0,5 ml 30%ige Brij-Lösung in
- 1 000 ml steriles aqua dest. geben;

aqua dest. mit NaN_3 :

- (für Kühlung an der Mischungsstelle von Probe und konzentrierter Schwefelsäure, sowie für die Cer- und Arsenleitungen beim Spülen);
- eine Spatelspitze (ca. 0,2 - 0,5 g) NaN_3 in
- 1 000 ml sterilen aqua dest. lösen;

PROBEN:

a) Standardlösungen

1,0 - 2,0 - 3,0 - 4,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 -
9,0 - 10,0 $\mu\text{g/dl}$ I^- in Form von KIO_3 in aqua
dest.;

b) Kontrollseren

- Normosic (Firma Asid):

PBI $6,85 \pm 0,65$ $\mu\text{g/dl}$;

- Moni-Trol (Firma Merz und Dade):

PBI $11,1 \pm 0,9$ $\mu\text{g/dl}$;

- die Kontrollseren wurden 1:2 in 0,9 g% NaCl
verdünnt eingesetzt;

c) Thyreoglobulin-Lösungen

Gemessen wurden gereinigtes, humanes Thyreoglobulin und humanes, desialisiertes Thyreoglobulin (2.3.4.) nativ und nach enzymatischer in vitro Jodierung (2.3.6.). Bei einer Konzentration der Thyreoglobulin-Lösungen von 1 bis 6 mg/ml (bestimmt mit der Methode nach Lowry (2.2.3.)) und einem zu erwartenden Jodgehalt von 5 bis 120 Atomen Jod pro Thyreoglobulin-Molekül (93) war mit einer Jodidkonzentration der Lösungen im Bereich von 100 bis 10 000 $\mu\text{g/dl}$ zu rechnen. Dementsprechend wurden Verdünnungen von jeweils 1:100 und 1:1 000 hergestellt, um in den Meßbereich von 1 - 10 $\mu\text{g/dl}$ zu gelangen. Gemessen wurde jeweils zunächst die höhere Verdünnung.

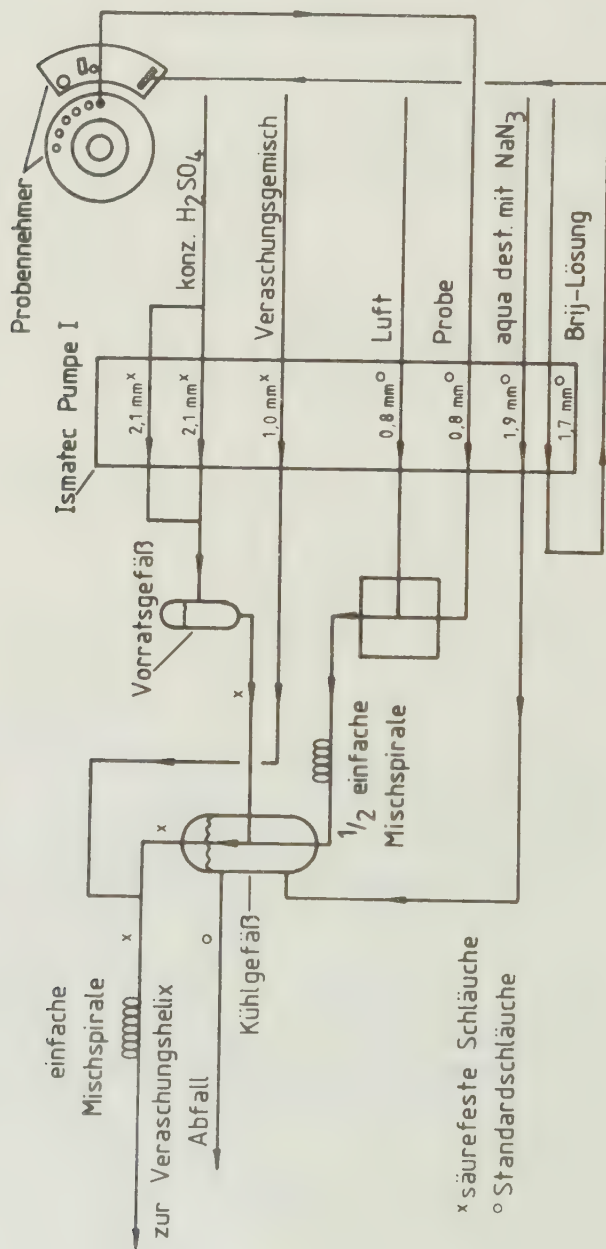


Abb. 13: Fluiddiagramm für Probe und Reagenzien vor Eintritt in die Veraschungshelix bei der chemischen Gesamtjodbestimmung

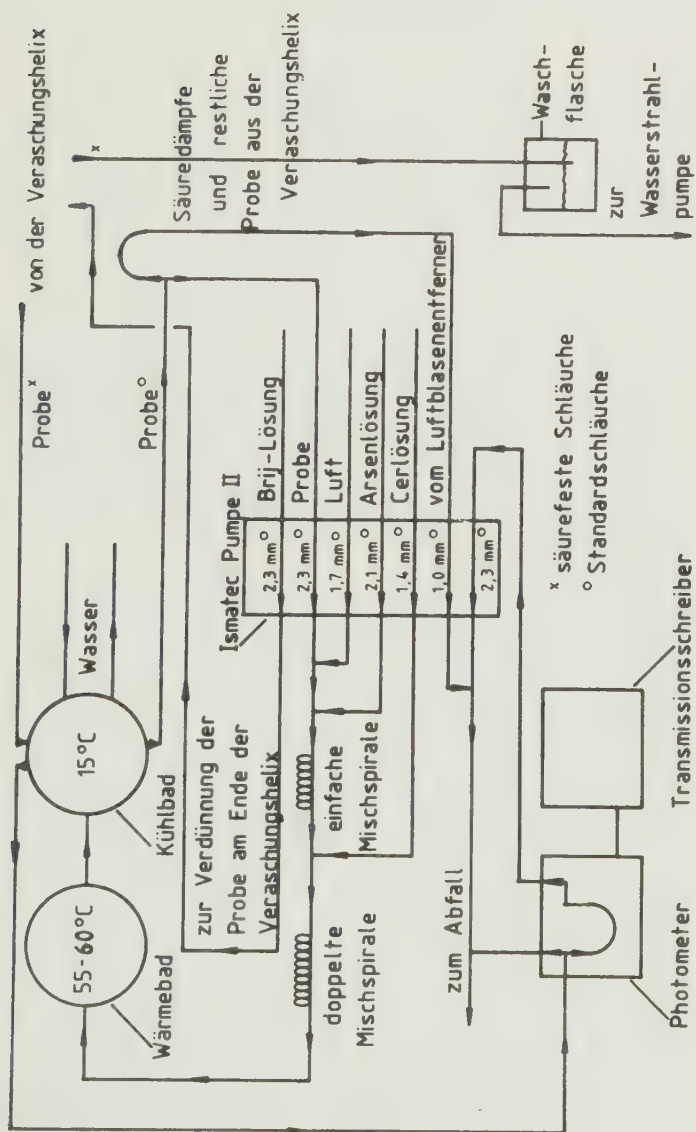


Abb.14: Flußdiagramm für Probe und Reagenzien nach Austritt aus der Veräuschungshelix bei der chemischen Gesamtjodbestimmung

ABLAUF DER CHEMISCHEN GESAMTJODBESTIMMUNG

Die Messung des Jodgehaltes von humanem Thyreoglobulin wurde mit einem Technicon-Autoanalyzer automatisch im geschlossenen System durchgeführt. Die Funktionsweise des Systems erläutern die beiden Abbildungen 13 und 14 (S.72 und 73), deren Verbindung die Veraschungshelix bildet.

Der angesaugten Probe (ca. 400 μ l) wurde konzentrierte Schwefelsäure und Veraschungsgemisch zugesetzt. Bei + 240 °C erfolgte dann in der Veraschungshelix die Veraschung des organischen Materials. Nach Durchlaufen der Veraschungshelix wurden der aufgeschlossenen Probe Arsen- und Cerlösung zugesetzt. Die durch anorganisches Jod katalysierte Reduktion von Ce^{4+} durch As^{3+} (siehe theoretische Grundlagen) erfolgte während einer ca. 15 minütigen Passage durch ein ca. + 60 °C warmes Öl-Wärmebad. Nach Austritt aus der Veraschungshelix sowie vor der photometrischen Transmissionsmessung bei $\lambda = 415 \text{ nm}$ wurde das Reaktionsgemisch in einem ca. + 15 °C warmen Wasserbad gekühlt.

Die Beimischung von Luftblasen (siehe Abb.13 und 14) verhinderte Vermischungen von Probe zu Probe und ermöglichte das Mischen in den vertikalen Mischschlangen (Abb.13 und 14). Die Zufuhr von Detergenslösung (Brij-Lösung) diente der Stabilisierung des Luftblasenmusters.

Mit den Standardlösungen von 1,2,3,4,5,6,7,8,9 und 10 $\mu\text{g/dl I}^-$ in Form von KIO_3 wurde eine Eichkurve erstellt. Kontrollen wurden mit Seren hoher und niedriger Konzentration an proteingebundenem Jod ($6,85 \pm 0,65$ bzw. $11,1 \pm 0,9 \mu\text{g/dl}$, eingesetzt in 1:2 Verdünnung) durchgeführt. Die Eichung wurde nach Messung von jeweils 20 Proben wiederholt.

Es wurde in Doppelwerten gemessen. Die Messung einer Probe dauerte ca. 20 Minuten. Pro Stunde konnten 20 Proben analysiert werden.

2.2.7. Bestimmung des Jodthyroningehaltes von humanem Thyreoglobulin

Zur Bestimmung des Trijodthyronin (T_3)- und Thyroxin (T_4)-Gehaltes wurde humanes Thyreoglobulin durch saure Hydrolyse in 1 M HCl bei + 100 °C in seine Aminosäuren aufgespalten. Im Hydrolysat wurden die T_3 - und T_4 -Konzentrationen radioimmunologisch bestimmt.

Als Probe wurde gereinigtes, sialisiertes und desialisiertes, humanes Thyreoglobulin unterschiedlichen Jodgehaltes verwendet. Es wurde als Lösung in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 in einer Konzentration von 1 -6 mg/ml eingesetzt.

2.2.7.1. Saure Hydrolyse von Thyreoglobulin

Die saure Hydrolyse wurde in silikonisierten Glasröhrchen ($\varnothing$ 7 mm, Höhe 60 mm) durchgeführt. Zur Silikonisierung wurden die Röhrchen mit Silikonlösung (Fa. Ser-va, Heidelberg) benetzt und anschließend bei + 100 °C in einem Wärmeschrank getrocknet.

Zu 50 μ l Thyreoglobulin-Lösung wurde 1 ml 1 M HCl gegeben und bei + 100 °C in einem Wärmeschrank über 8 bis 10 Stunden hydrolysiert. Hierbei wurden die Glasröhrchen mit Glaskugeln verschlossen. Dadurch wurde einerseits die Verdunstung der Lösung bis zur vollständigen Hydrolyse verzögert. Andererseits wurde die Verdunstung der Lösung innerhalb von 8 bis 10 ermöglicht, um das Hydrolysat anschließend für die radioimmunologische

Bestimmung der T_3 - und T_4 -Konzentrationen nicht durch Umpuffern zu stark zu verdünnen. Das als bräunlicher Bodenkörper abgesetzte Hydrolysat wurde in 1 ml 0,1% BSA ($\hat{=}$ 1:20 Verdünnung des Ausgangsmaterials) als Matrix für die radioimmunologischen Bestimmungen gelöst. Die Hydrolyse wurde in Doppelwerten durchgeführt. Untersuchungen mit ^{125}I markiertem T_4 und T_3 , sowie mit "kaltem" Standard für T_4 und T_3 ergaben für die beschriebene Methode eine Wiederfindung von $80\% \pm 4\%$ ($\bar{x} \pm s$).

2.2.7.2. radioimmunologische Bestimmung von Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4)

Die Bestimmung von T_3 - und T_4 -Konzentrationen wurde mit einem Doppelantikörper-Radioimmunoassay durchgeführt. Die verwendeten spezifischen Kaninchen-Antiseren besaßen Bindungsoptima bei extremen pH-Werten: pH 3,8 - 4,2 für das T_4 -Antiserum, pH 8,5 - 10,0 für das T_3 -Antiserum (43). Damit ergab sich ein proteinunabhängiger — insbesondere von Konzentrationen des Thyroxin bindenden Globulins (TBG) unabhängiger — Radioimmunoassay (43).

Der zur Präzipitation der spezifischen Kaninchen-Antiseren verwendete zweite Antikörper (vom Esel) reagiert bevorzugt bei neutralem pH-Wert mit dem ersten Antikörper. Somit war eine Vorinkubation von erstem und zweitem Antikörper bei neutralem pH-Wert erforderlich.

Innerhalb von 24 Stunden erfolgte weder bei pH 3,0 noch bei pH 11,0 eine Dissoziation der Antikörperkomplexe (43).

Die Thyreoglobulin-Hydrolysate wurden zur Messung ihrer T_3 -Konzentrationen 1:100 verdünnt und zur Messung ihrer T_4 -Konzentrationen unverdünnt verwendet, was einer Verdünnung der ursprünglich eingesetzten Thyreoglobulin-Lösungen (50 μ l 1 - 6 mg/ml konzentriertes Thyreoglobulin) von 1:2 000 bzw. 1:20 entsprach. Die Messungen wurden in Doppelwerten durchgeführt.

Ansatz zum T₄-Radioimmunoassay

- 10 µl Probe bzw. Standard (0 - 0,78 - 1,56 - 3,12 - 6,25 - 12,5 - 25,0 µg/dl T₄)
bzw. Kontrollen;
+ 120 µl ¹²⁵I markierter T₄-Tracer (in 0,1 M HCl mit 20% Propylenglycol;
+ 100 µl vorinkubiertes Gemisch aus I. und II. Antikörper in 0,9% NaCl (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde ein Gemisch aus Kaninchen-γ-Globulin und II. Antikörper in 0,9% NaCl eingesetzt);
-

Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens
2 Stunden

- + 900 µl 0,9% NaCl mit 0,02g% NaN₃;
15 min bei ca. 3 500 g zentrifugieren;
Überstand absaugen;
-

- + 900 µl 0,9% NaCl mit 0,02g% NaN₃;
15 min bei ca. 3 500 g zentrifugieren;
Überstand absaugen;
-

im γ-Counter zählen;

Ansatz zum T_3 -Radioimmunoassay

- 25 μ l Probe bzw. Standard (0 - 6,25 - 12,5 - 25,0 - 50,0 - 100 - 200 ng/dl T_3 in 0,1 g% BSA;
bzw. Kontrollen;
+ 200 μ l 0,1n NaOH;
+ 100 μ l 0,43 M Glycin-NaCl;
+ 100 μ l 125 I- T_3 -Tracer in 0,1 M HCl mit 20% Propylenglycol;
+ 100 μ l vorinkubiertes Gemisch aus I. und II. Antikörper (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde ein Gemisch aus Kaninchen- γ -Globulin und II. Antikörper eingesetzt);
-

Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht

- + 500 μ l 0,9 g% NaCl mit 0,02 g% NaN_3 ;
15 min bei ca. 3 500 g zentrifugieren;
Überstand absaugen;
+1000 μ l 0,9 g% NaCl mit 0,02 g% NaN_3 ;
15 min bei ca. 3 500 g zentrifugieren;
Überstand absaugen;
-

im γ -Counter zählen;

2.2.8. Bestimmung von Jodidkonzentrationen mit einer ionenselektiven Jodidelektrode

Meßprinzip

Ionenselektive Elektroden zur Messung von Jodidkonzentrationen in wässrigen Lösungen arbeiten nach demselben Prinzip wie Glaselektroden zur Messung von pH-Werten (19). Die verwendete Elektrode gehörte zu den Festkörperelektroden, deren Membran ein Mischpreßling aus AgS und AgI war. Abhängig von der Ag^+ - Konzentration der Meßlösung entsteht an der Grenzfläche Membran-Meßlösung eine Potentialdifferenz, die durch die Nernst'sche Gleichung beschrieben wird:

$$E = E_{\text{O}} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln [A]$$

mit:

E : gemessenes Potential in Volt

E_{O} : Normalpotential der zu messenden Substanz
in Volt

R : allgemeine Gaskonstante: $8,34 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T : Temperatur in [K]

n : Anzahl und Vorzeichen der Ladungen des zu messenden Ions

F : Faraday'sche Konstante: $96\,484 \text{ C}$

$[A]$: Konzentration der zu messenden Substanz

Im vorliegenden Fall gilt also:-

$$E = E_{\text{O}} + 0,059 \lg \text{Ag}^+ \text{ [V]}; \quad \text{für } T = 298[\text{K}]$$

Um das entstehende Potential messen zu können, wird eine Referenzelektrode benötigt, deren Potential unabhängig von der Zusammensetzung der Meßlösung konstant ist. Hierzu ist z.B. eine Ag/AgCl-Elektrode mit doppeltem Stromschlüssel geeignet: Ein mit AgCl beschichteter Silberdraht taucht in eine mit AgCl und KCl gesättigte Lösung. Diese innere Kammer steht über eine Membran mit einer mit 10%igem KNO_3 gefüllten äußeren Kammer in Verbindung, die wiederum über ein Schliffdiaphragma Kontakt zur Meßlösung hat. Durch die gesättigte Lösung der inneren Kammer wird zwischen Ag/AgCl-Draht und der Lösung ein konstantes Potential aufrecht gehalten. Diffusion zwischen innerer und äußerer Kammer ist sehr gering und erfolgt auch zwischen äußerer Kammer und der Meßlösung nur langsam. Um die Funktion der Referenzelektrode aufrecht zu halten, genügt es, die innere Lösung wöchentlich und die äußere täglich zu erneuern.

Meß- und Referenzelektrode stehen über die Meßlösung und über ein Spannungsmeßgerät in Verbindung. Das Voltmeter muß einen sehr hohen Widerstand ($R \approx 10^{12} \Omega$) besitzen, um einen Stromfluß zwischen den Elektroden sehr gering zu halten und damit Konzentrationsänderungen der zu messenden Substanz an den Elektroden zu verhindern (19).

Die ansich für Ag^+ selektive Jodidelektrode ist auch zur Messung von I^- geeignet, da Ag^+ und I^- ein schwer lösliches Salz ($L_p = 10^{-16} [\text{M}^{-2}]$) bilden. Somit hängt die Konzentration der I^- - Ionen von der Konzentration der Ag^+ - Ionen ab.

Der lineare Meßbereich der verwendeten Anordnung reichte von $5 \cdot 10^{-1}$ bis $2 \cdot 10^{-8} [\text{M}] \text{I}^-$.

Eichung und Probenmessung

Mit zwei verschiedenen konzentrierten Kaliumjodid-Standardlösungen für den gewählten Meßbereich wurde eine Zweipunkt-Kalibrierung durchgeführt: Das in der höher konzentrierten Standardlösung gemessene Potential wurde dem Mikroprozessor als die entsprechende Jodidkonzentration eingegeben. Mit der zehnfach niedriger konzentrierten zweiten Standardlösung wurde die Steilheit der Eichkurve festgelegt. Entsprechend der Nernst'schen Gleichung ergab sich eine Eichkurvensteigung von -59 ± 2 mV pro Konzentrationsunterschied um den Faktor 10. Mit dem geeichten Meßsystem konnten nun die Proben gemessen werden.

Um rascher ein stabiles Meßsignal zu erhalten, wurden die Probelösungen während der Messung mit einem Magnetrührer vorsichtig gerührt. Die Meßergebnisse konnten so nach ca. 1 min abgelesen werden.

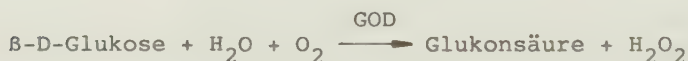
Die Eichung wurde alle 2 Stunden wiederholt.

Nach jeder Messung wurden Jodid- und Referenzelektrode mit aqua dest. abgespült und mit einem Filterpapier getrocknet. Zwischen den Messungen wurden die Elektroden in 0,1 M Kaliumjodidlösung getaucht.

2.2.9. Enzymatische in vitro Jodierung von humanem Thyreoglobulin mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase

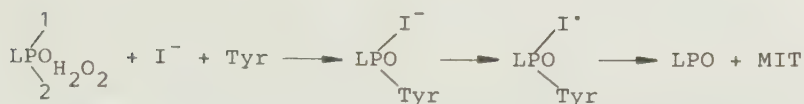
Prinzip

Humanes Thyreoglobulin wurde mit dem Laktoperoxidase/Glukoseoxidase-System in einem Ansatz nach Kohler et al. (64) enzymatisch in vitro jodiert. Dieses Enzymsystem ermöglicht die Synthese von Jodtyrosinen und Jodthyroninen im Thyreoglobulinmolekül. Das für die durch Laktoperoxidase (LPO) katalysierte Jodierungsreaktion benötigte H_2O_2 liefern Glukose und Glukoseoxidase (GOD) entsprechend folgender Reaktionsgleichung:

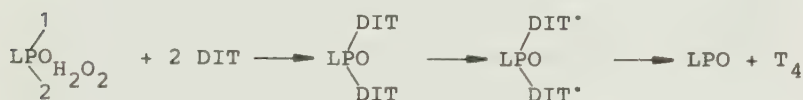


Gegenüber einer chemischen Bildung von H_2O_2 (z.B. nach der Chloramin-T Methode) bietet die enzymatische Reaktion den Vorteil, daß die H_2O_2 Entstehung durch die Folgereaktion reguliert wird. Eine Inhibierung der Laktoperoxidase oder eine Proteindenaturierung durch überschüssiges H_2O_2 können hierdurch verhindert werden.

Laktoperoxidase bildet mit H_2O_2 als Wasserstoff- bzw. Elektronenakzeptor einen Komplex, der vermutlich zwei Substratbindungsstellen besitzt und über die Bildung von Jod- und Tyrosinradikalen die Jodierung der Tyrosylreste von Thyreoglobulin zu Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) katalysiert (nach (94)):



Ebenso verläuft vermutlich die Kopplungsreaktion der Jodtyrosine zu Jodthyroninen über die Bildung von Monojodtyrosin- und Dijodtyrosinradikalen (nach (94)):



BENÖTIGTE LÖSUNGEN

- gereinigtes, humanes Thyreoglobulin 5 mg/ml;
- β-D-Glukose 20 mg/ml;
- Kaliumjodid 13,3 µg/ml;
- Laktoperoxidase 750 mU/ml;
- Glukoseoxidase 50 mU/ml;
- Methylmercaptoimidazol (MMI) 5,0 mg/ml;

Alle Lösungen wurden in 0,12 M Phosphatpuffer pH 7,0 angesetzt.

Durchführung

Zur enzymatischen Jodierung von humanem Thyreoglobulin wurden die benötigten Lösungen nach folgendem Schema in einem Reagenzglas zusammenpipettiert:

- 400 μ l 0,12 M Phosphatpuffer pH 7,0
- 400 μ l Thyreoglobulinlösung (5 mg/ml)
- 400 μ l β -D-Glukoselösung (20 mg/ml)
- 1 200 μ l Kaliumjodidlösung (13,3 μ g/ml)
- 800 μ l Laktoperoxidaselösung (750 mU/ml)

Durch Zugabe von 800 μ l Glukoseoxidaselösung (50 mU/ml) wurde die Jodierungsreaktion gestartet. Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte bei + 37 °C in einem Wasserbad. Nach ca. 40 min war die Jodierungsreaktion vollständig abgelaufen. Durch Zugabe von 400 μ l Methylmercaptoimidazolösung (5 mg/ml) konnte die Reaktion jederzeit gestoppt werden.

Sollte im Thyreoglobulinmolekül ein maximaler Jod- und Jodthyroningehalt erreicht werden, so wurden nach je 60 und 120 min je 25 μ l einer Lösung von 1 mg/ml Kaliumjodid zugegeben. Die Reaktion wurde nach 180 min durch Zugabe von 400 μ l Methylmercaptoimidazolösung gestoppt.

Inkubationen ohne Kaliumjodid bzw. ohne Glukoseoxidase oder ohne Laktoperoxidase wurden angesetzt, um mögliche unspezifische Veränderungen des Thyreoglobulinmoleküls während der enzymatischen Jodierung zu erfassen. Ohne Thyreoglobulin wurde inkubiert, um festzustellen, ob Jodid auch verbraucht wird, ohne in das Thyreoglobulinmolekül eingebaut zu werden, z.B. durch Oxidation von I^- zu I_2 . Das jeweils weggelassene Reagenz wurde durch

ein entsprechendes Volumen 0,12 M Phosphatpuffers pH 7,0 ersetzt.

Zur Untersuchung mit isoelektrischer Fokussierung (2.2.4.) wurden die Probenlösungen nach der enzymatischen in vitro Jodierung durch Vakuumdialyse mit Kolloidiumhülsen auf eine Konzentration von 2 bis 5 mg/ml Thyreoglobulin gebracht. Gleichzeitig wurde gegen 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 dialysiert. Hierdurch konnte eine für die isoelektrische Fokussierung geeignete Osmolarität, sowie eine weitgehende Entfernung noch vorhandenen Jodids erreicht werden.

2.2.10. Nachweis endogen ^{131}I -markierten Thyreoglobulins mit isoelektrischer Fokussierung und Autoradiographie

Mit einem Doppel-Antikörper-Radioimmunoassay für Thyreoglobulin läßt sich bei Schilddrüsengesunden und insbesondere bei verschiedenen Erkrankungen der Schilddrüse Immunoreaktivität im Serum nachweisen (42,45). Um herauszufinden, ob diese immunoreaktive Substanz mit intrathyreoidalem Thyreoglobulin identisch ist, wurden die Seren ^{131}I -therapierter Patienten mit der hochauflösenden isoelektrischen Fokussierung und Autoradiographie untersucht. Indikation der ^{131}I -Therapie waren autonome Adenome und M. Basedow. Bei diesen Patienten werden signifikant erhöhte Serumspiegel für immunoreaktives Thyreoglobulin gefunden (45). Darüberhinaus wird während der ^{131}I -Therapie intrathyreoidales Thyreoglobulin endogen mit ^{131}I markiert und kann nach Auftrennung mit isoelektrischer Fokussierung trotz der niedrigen Konzentrationen in der Autoradiographie nachgewiesen werden.

Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Seren wegen autonomer Adenome bzw. M. Basedow ^{131}I therapiierter Patienten wurden vor und 1, 2, 3, 4 und 6 Wochen nach Applikation der therapeutischen ^{131}I -Dosis gewonnen.

Albumin und Thyroxin-bindendes-Globulin (TBG) mußten vor der Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung aus den Seren weitgehend abgetrennt werden. Beide Proteine binden ^{131}I -markiertes Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) und überlagern damit die Banden in der Autoradiographie. Erreicht wurde die Abtrennung von Albumin und TBG durch Filtration der Seren in Amicon B-125 Kammern. Diese Kammern besitzen eine semipermeable Membran mit einer Ausschlußgrenze für Moleküle größer 125 000 g/mol. Moleküle kleiner als 10 000 g/mol werden hierbei vollständig, Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 125 000 g/mol partiell aus der Probe entfernt.

In den Amicon B-125 Kammern konnten die Seren auch auf die für den autoradiographischen Nachweis des immuno-reaktiven Thyreoglobulins erforderliche Aktivität konzentriert werden. Als Nachweisgrenze wurde eine Aktivität von 1 000 cpm/ml (gemessen im γ -Counter) ermittelt, wobei für die isoelektrische Fokussierung nur 5 μl Probe eingesetzt wurden.

Zum Filtrieren und Konzentrieren wurden je 1 ml Serum und 4 ml 0,15 M NaCl-Lösung in die Amicon B-125 Kammern gegeben und auf 1 ml konzentriert. Anschließend wurde zweimal mit je 4 ml 0,15 M NaCl aufgefüllt und je nach Aktivität des Serums auf 100 bis 1 000 μl konzentriert, mindestens auf 1 000 cpm/ml (gemessen im γ -Counter).

Die **isoelektrische Fokussierung** wurde wie unter 2.2.4. beschrieben im Bereich von pH 3,5 - 9,5 durchgeführt.

Zur **Autoradiographie** wurden die getrockneten IEF-Agarosegele mit den aufgetrennten Proben auf einen Röntgenfilm gelegt und für eine Woche in einer Röntgenfilmkassette belichtet. Die Filme wurden in einem Automaten zur Röntgenfilmentwicklung entwickelt.

3. E r g e b n i s s e

3.1. Reinigung von Thyreoglobulin durch Chromatographie auf ACA 22 Ultrogel

Die gelchromatographische Auftrennung der Extrakte aus Schilddrüsengewebeschnitten auf ACA22 Ultrogel (2.2.2.) ergab ein gut reproduzierbares Elutionsprofil bestehend aus 6 Hauptfraktionen (Abb.15).

Die gelchromatographischen Parameter sowie eine grob visuelle Beschreibung für die 6 Hauptfraktionen sind in Tabelle II zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle II

Gelchromatographische Parameter und visuelle Beschreibung der 6 Hauptfraktionen einer Chromatographie von 9 ml Extrakt aus 7 g Gewebe einer diffusen Kolloidstruma auf ACA 22 Ultrogel (Abb.15)

Fraktion Nr. (nach Abb.15)	V_e [ml]	K_{av}	visuelle Beschreibung		
			netzend	Farbe	klar/trüb
I	254	0,01	netzend	weißlich	stark trüb
II	319	0,15	netzend	weißlich	leicht trüb
III	351	0,22	netzend	farblos	klar
IV	423	0,38	netzend	farblos	klar
V	598	0,76	netzend	rötlich	klar
VI	715	1,02	netzend	gelblich	klar

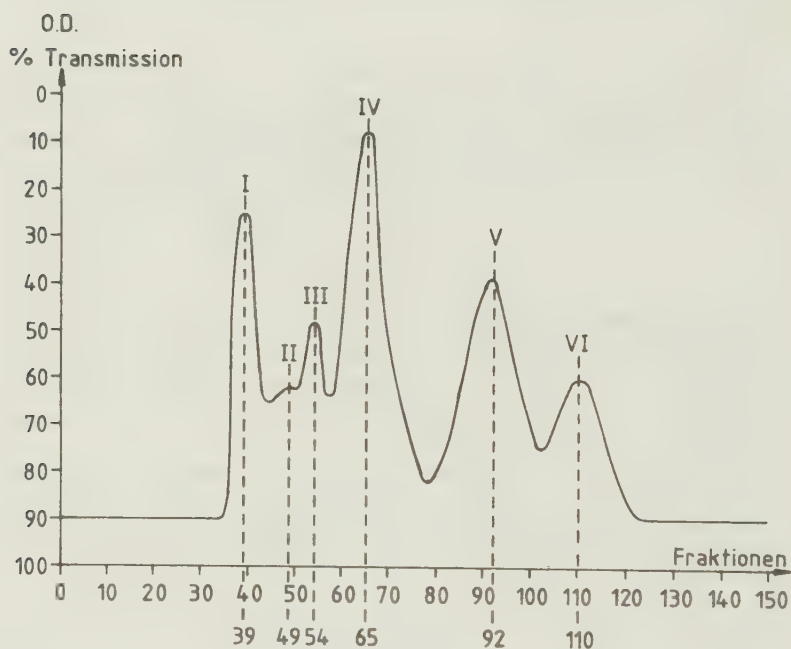


Abb.15: Elutionsprofil einer gelchromatographischen Auftrennung von 9 ml Extrakt aus 7 g Gewebe einer diffusen Kolloidstruma. Die Chromatographie erfolgte auf einer 3 x 100 cm messenden ACA 22 Ultrogel Säule mit $V_t = 707$ ml und $V_0 = 250$ ml. Eluiert wurde mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,15 M NaCl und 0,02 g% NaN_3 bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 15 ml/h. Es wurden Fraktionen zu je 150 Tropfen (ca. 6,5 ml) gesammelt. Die Transmissionsmessung erfolgte bei $\lambda = 280$ nm.

Die Fraktionen I und II waren stark lipidhaltig. Wegen des Lipidgehaltes und wegen des hohen Molekulargewichtes war eine Charakterisierung dieser Fraktionen durch Disc-, SDS- und Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese (3.2.) nicht möglich.

Fraktion III war eine klare Proteinlösung. In der SDS-Elektrophorese (3.2.) traten Banden wie bei reinem Thyreoglobulin auf (Abb.16, S.96). Darüberhinaus waren aber noch Verunreinigungen mit höhermolekularen Substanzen nachweisbar (Abb.16, S.96).

Fraktion IV war eine klare Proteinlösungen. Passend zu V_e und K_{av} konnte mit Disc- und Gradientengel-Elektrophorese, sowie anhand einer homogenen Bande in der SDS-Elektrophorese (3.2.) gezeigt werden, daß diese Fraktion ausschließlich Thyreoglobulin enthielt (Abb.16, S.96; Abb.18, S.98; Abb.19, S.99).

Auch die Fraktionen V und VI waren klare Proteinlösungen. Nach V_e und K_{av} mußte das Molekulargewicht dieser Fraktionen allerdings kleiner als 100 000 g/mol sein.

3.2. Untersuchungen zur Reinheit des isolierten Thyreoglobulins

Die Reinheit des isolierten Thyreoglobulins wurde mit Disc-Elektrophorese in verschiedenen konzentrierten Polyacrylamidgelen, sowie mit SDS-Elektrophorese überprüft. Durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen wurde das isolierte Thyreoglobulin durch sein Molekulargewicht charakterisiert.

3.2.1. Disc-Elektrophorese

Disc-Elektrophorese der gelchromatographischen Fraktionen wurden in 5%igen und 7,5%igen Polyacrylamid-Stackgelen durchgeführt. Bei beiden Gelkonzentrationen ergaben sich vergleichbare Ergebnisse (Abb.16 und 17).

Bei der gelchromatographischen Fraktion Nr.I blieb der größte Teil der Probe an der Oberfläche von Sammel- bzw. Trenngel liegen. Im Trenngel fand sich nur eine Fraktion mit $R_f = 0,23$.

Auch bei Fraktion Nr.II blieb ein großer Teil der Probe an der Oberfläche von Sammel- bzw. Trenngel liegen. Im Trenngel waren Banden bei $R_f = 0,04, 0,11, 0,16, 0,23$ und $0,39$ sichtbar.

Bei Fraktion Nr.III war die gesamte Probe in das Trenngel gewandert. Hier fanden sich Fraktionen bei $R_f = 0,03, 0,07, 0,10, 0,23$ und $0,42$. Die Hauptfraktionen lagen bei $R_f = 0,03, 0,07$ und $0,10$. Diffus verteilte Probe war im Bereich von $R_f = 0,01$ bis $0,17$ anfärbbar.

Fraktion Nr.IV ergab zwei Banden bei $R_f = 0,28$ und $0,43$. Die Bande bei $R_f = 0,28$ war die deutlich stärkere Fraktion.

Bei den gelchromatographischen Fraktionen Nr.V und Nr.VI traten nur Banden mit höheren R_f -Werten auf. Bei Fraktion Nr.V färbte sich der Bereich von $R_f = 0,61$ bis $0,78$ mit einem Intensitätspeak bei $R_f = 0,73$. Bei Fraktion VI war lediglich eine schwache Fraktion mit $R_f = 0,63$ erkennbar.

Bezugspunkt für die Berechnung der R_f -Werte war jeweils das anodale Gelende.

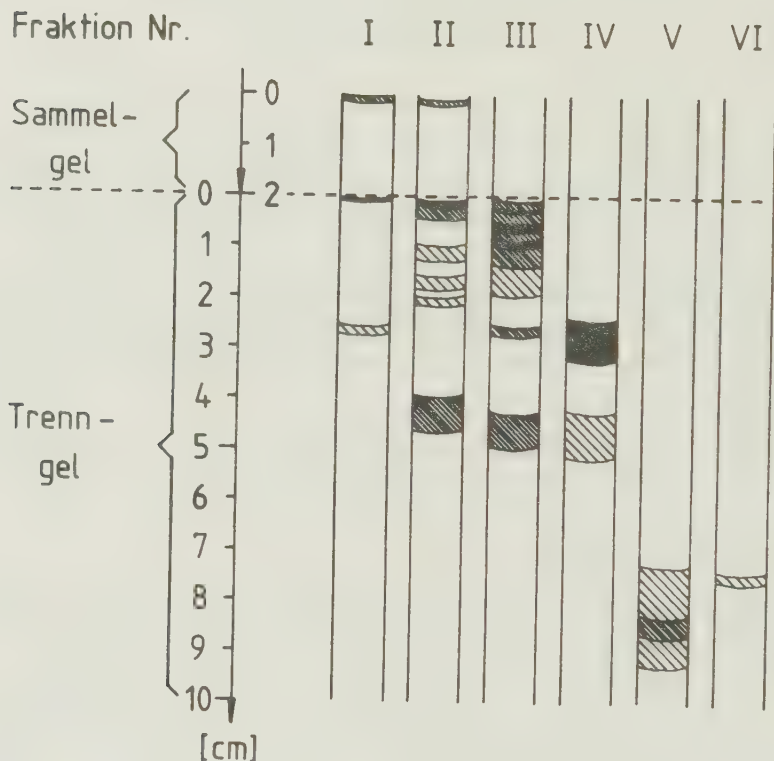


Abb.16: Schematische Darstellung der Ergebnisse einer Disc-Elektrophorese der 6 gelchromatographischen Fraktionen von Extrakten aus Schilddrüsengewebeschnitten in $0,6 \cdot 15,0$ cm messenden Polyacrylamid-Stabgelen mit $T = 5\%$ und $C = 3\%$. Es wurden je $50 \mu\text{l}$ Probe mit je $200 \mu\text{g}$ in Probenpuffer gelöstem Lyophilisat der einzelnen Fraktionen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 6 mA/Gel über 5 h .

Bei der vergleichenden Disc-Elektrophorese in verschiedenen Polyacrylamid-Gelkonzentrationen mit Lyophilisat der gelchromatographischen Fraktion Nr.IV zeigte sich je eine langsam wandernde Hauptfraktion und eine schneller wandernde kleinere Fraktion (Abb.17).

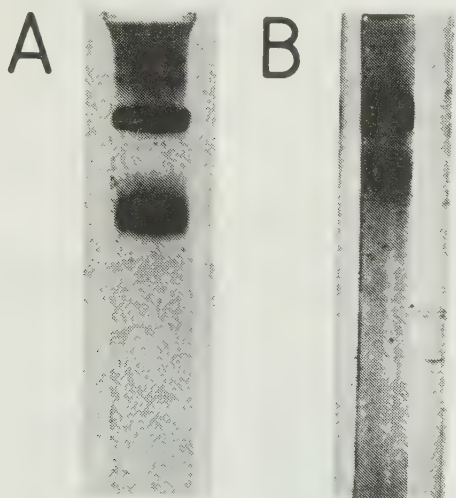


Abb.17: Disc-Elektrophorese in 0,6 • 15,0 cm messenden Polyacrylamid-Stabgelen mit:

A: T = 5%, C = 3% und

B: T=7,5%, C=3%.

Es wurden je 50 μ l mit je 200 μ g in Probenpuffer gelöstem Lyophilisat der gelchromatographischen Fraktion Nr.IV von Extrakten aus Schilddrüsengewebeschnitten aufgetragen.

3.2.2. SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen auf homogenen Polyacrylamid-Flachbettgelen

Wie Abb.18 zeigt, ergab Fraktion Nr.IV der gelchromatographischen Auftrennung von Extrakten aus Schilddrüsengewebeschnitten (3.1.) bei SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen auf Polyacrylamid-Flachbettgelen eine homogene Bande. Aus dem R_f -Wert der Probe wurde anhand einer mit Referenzproteinen erstellten Eichkurve ein Molekulargewicht von 330 000 g/mol ermittelt.

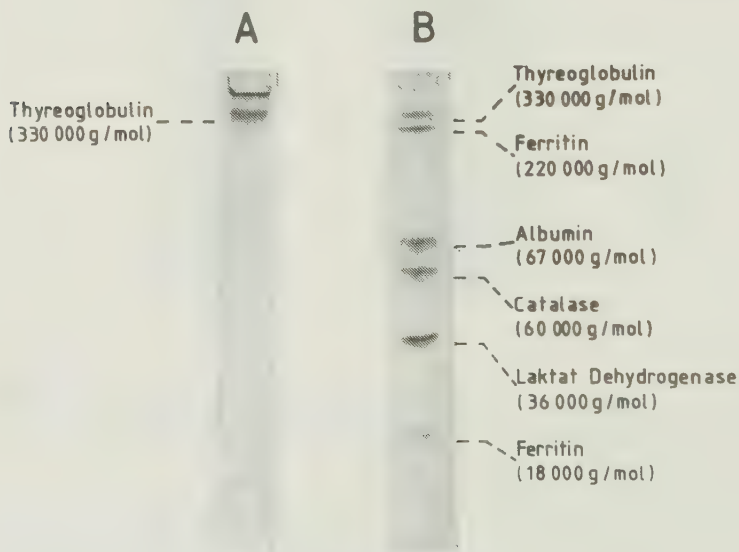


Abb.18: Auftrennung von **A:** Fraktion Nr.IV der Gelchromatographie von Extrakten aus Schilddrüsengewebeschnitten und **B:** Referenzproteinen durch SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen auf einem homogenen Polyacrylamid-Flachbett-Gel mit $T = 5,1\%$ und $C = 2,6\%$.

3.2.3. Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gradientengelen

Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gradientengelen ermöglichte die Molekulargewichtsbestimmung von nativem Thyreoglobulin. Bei Untersuchung der gelchromatographischen Fraktion Nr. IV (3.1.) färbten sich eine hochmolekulare Hauptbande und eine wenig intensive Bande mit niedrigerem Molekulargewicht (Abb.19).

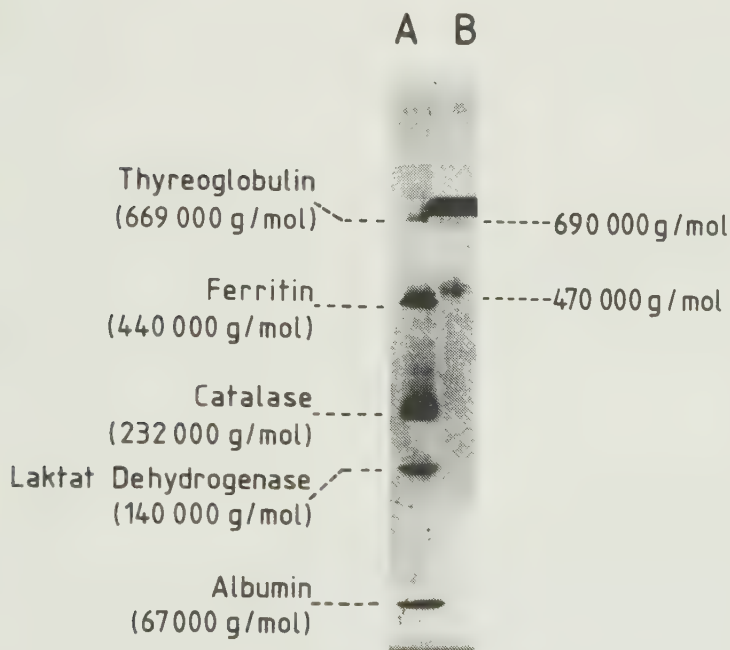


Abb.19: Elektrophoretische Auftrennung von **A:** Referenzproteinen und **B:** Fraktion Nr.IV der Gelchromatographie von Extrakten aus Schilddrüsengewebschnitten in Polyacrylamid-Gradientengelen mit $T = 4\%$ bis 30% .

Anhand einer mit Referenzproteinen erstellten Eichkurve wurden für die beiden Banden Molekulargewichte von ca. 690 000 g/mol bzw. ca. 470 000 g/mol abgelesen.

3.3. N-Acetyl-Neuraminsäure-Gehalt von humanem Thyreoglobulin

Für humanes Thyreoglobulin (Tg) aus 8 verschiedenen Präparationen wurde im Thiobarbitursäure-Assay nach L. Warren (137) in Thyreoglobulinlösungen verschiedener Konzentration ein mittlerer N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA)-Gehalt von $25,8 \pm 3,4$ mol NANA/mol Tg ($\bar{x} \pm s$) gemessen (Tab.III). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Thyreoglobulinpräparaten, die aus diffusen oder nodösen Strumen, oder aus Strumen bei M. Basedow gewonnen wurden.

Nach enzymatischer in vitro Desialisierung mit Neuramidase aus vibrio cholerae (2.2.5.1.) fiel der N-Acetyl-Neuraminsäure-Gehalt von Thyreoglobulin aus 4 verschiedenen Präparationen auf Werte unter 2 mol NANA/mol Tg (Tab.III). Thyreoglobulin konnte also nahezu vollständig desialisiert werden.

Tabelle III

N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA)-Gehalt von nativem und in vitro desialisiertem Thyreoglobulin (Tg)

	natives Tg [mol NANA/mol Tg]	desialisiertes Tg [mol NANA/mol Tg]
$\bar{x}$	25,8	0,85
s	3,4	0,87
n	8	4

3.4. Jod- und Jodthyronin-Gehalt von humanem Thyreoglobulin

Für Thyreoglobulin aus den verschiedenen untersuchten Schilddrüsengeweben wurde ein **Jodgehalt** von 3 bis 8 Atomen Jod pro Molekül Thyreoglobulin gemessen. Dies entsprach einem Anteil von 0,06 bis 0,15 Gewichtsprozent Jod pro Thyreoglobulinmolekül. Der **Jodthyroningehalt** wurde mit 0,10 - 0,40 mol T_3 /mol Tg und 0,10 - 0,30 mol T_4 /mol Tg bestimmt. Damit waren 10 - 15% des Jods in T_3 und 13 - 15% in T_4 enthalten. Bei Thyreoglobulinpräparaten aus diffusen und nodösen Strumen, oder aus Strumen bei M. Basedow wurde kein signifikanter Unterschied im Gesamtjod- und Jodthyroningehalt gefunden (Tab.IV). Der niedrigste Jodgehalt wurde mit 2 - 3 Atomen Jod pro Molekül Thyreoglobulin in Thyreoglobulin aus kalten Knoten nodöser Strumen gefunden.

Tabelle IV

Jod- und Jodthyronin-Gehalt von humanem Thyreoglobulin aus
diffusen Strumen, paranodulärem Schilddrüsengewebe und
Schilddrüsen bei M. Basedow

Gesamtjodgehalt	T_3 -Gehalt	T_4 -Gehalt
3 - 8 [Atome Jod/Molekül Tg]	0,10 - 0,40 [mol T_3 /mol Tg]	0,10 - 0,30 [mol T_4 /mol Tg]
0,06% - 0,15% [g I/g Tg]	10% - 15% [T_3 -Jod/Gesamtjod]	13% - 15% [T_4 -Jod/Gesamtjod]

Um auch höher jodiertes Thyreoglobulin mittels isoelektrischer Fokussierung untersuchen zu können, wurde das präparierte, jodarme Thyreoglobulin *in vitro* mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase enzymatisch jodiert. Die Kinetik dieses enzymatischen Jodierungssystems wurde durch Messungen der Jodidkonzentrationen im Inkubationsmedium mit einer ionenselektiven Jodidelektrode, sowie durch Bestimmung des Gesamtjodgehaltes im jodierten Thyreoglobulin nach unterschiedlichen Inkubationszeiten quantifiziert.

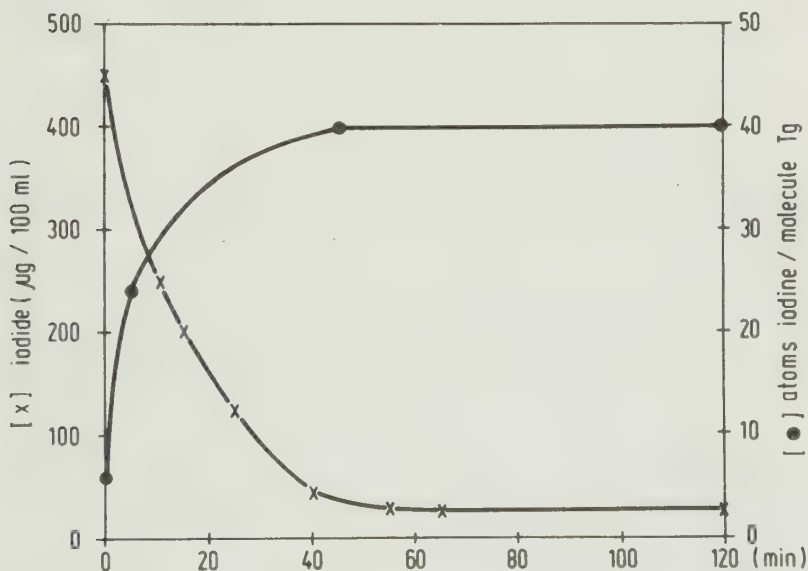


Abb.20: Kinetische Messung von Jodidkonzentration im Inkubationsmedium und Gesamtjodgehalt von Thyreoglobulin während enzymatischer *in vitro* Jodierung mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase bei 50 fach molarem Jodidüberschuß

Bei einem 50 fach molaren Überschuß an Jodid gegenüber Thyreoglobulin waren innerhalb der ersten 5 min ca. 50%, nach 40 min über 90% des eingesetzten Jodids in Thyreoglobulin inkorporiert (Abb.20). Die gute Korrelation zwischen Abnahme der Jodidkonzentration im Inkubationsmedium und in Thyreoglobulin organifizierter Jodmenge (Abb.20) ließ den Schluß zu, daß Jodid ausschließlich in Thyreoglobulin eingebaut wurde und nicht z.B. durch Oxidation zu Jod und Sublimation oder Jodierung der Enzyme verloren ging.

In drei verschiedenen Experimenten wurde Thyreoglobulin aus verschiedenen Präparationen bei 50 bzw. 150 fach molarem Überschuß an Jodid enzymatisch mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase in vitro jodiert und jeweils vor und nach der Jodierung Jod- und Jodthyronin -Gehalt des Thyreoglobulins gemessen (Tab.V). Bei Jodierung mit 50 fach molarem Jodidüberschuß stieg der mittlere Gesamtjodgehalt von Thyreoglobulin von 6,5 Atomen Jod/Molekül Tg auf 61,6 Atome Jod/Molekül Tg. Der prozentuale Jodgehalt des Thyreoglobulins nahm damit von 0,13% auf 1,19% zu. Der mittlere Jodthyroningehalt erhöhte sich von 0,22 mol T_3 /mol Tg auf 0,69 mol T_3 /mol Tg und von 0,18 mol T_4 /mol Tg auf 1,17 mol T_4 /mol Tg. Bei Jodierung mit 150 fach molarem Überschuß an Jodid stieg der Gesamtjodgehalt von Thyreoglobulin weiter auf 116,9 Atome Jod/Molekül Tg, was einem prozentualen Jodgehalt von 2,25% entsprach. Der Jodthyroningehalt erhöhte sich auf 1.10 mol T_3 /mol Tg und 1,88 mol T_4 /mol Tg. Somit wurde durch enzymatische in vitro Jodierung der T_3 -Gehalt verfünffacht und der T_4 -Gehalt verzehnfacht. Der in den Jodthyroninen gebundene Anteil des Gesamtjodgehaltes fiel dabei für T_3 von 10,2% bei 50 fach molarem Jodidüberschuß auf 3,4% und bei 150 fach molarem Jodidüberschuß auf 2,8%, für T_4 von 11,1% auf 7,6% und 6,4%. Der in den Jodthyroninen ins-

gesamt enthaltenen Teil des Gesamtjods betrug bei 6,5 Atomen Jod/Molekül Tg ca. 21%, bei 62 Atomen Jod/Molekül Tg ca. 11% und bei 117 Atomen Jod/Molekül Tg ca. 9% (Tab.V).

Tabelle V

Jod- und Jodthyroningehalt von Thyreoglobulin (Tg) vor und nach enzymatischer in vitro Jodierung mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase

(Ergebnisse aus drei Experimenten mit Thyreoglobulin aus drei verschiedenen Präparationen)

	Gesamtjodgehalt $\frac{[\text{Atome Jod}]}{[\text{Molekül Tg}]}$ $\frac{[\text{g I}]}{[\text{g Tg}]}$	T ₃ -Gehalt $\frac{[\text{mol T}_3]}{[\text{mol Tg}]}$ $\frac{[\text{T}_3\text{-Jod}]}{[\text{Gesamtjod}]}$	T ₄ -Gehalt $\frac{[\text{mol T}_4]}{[\text{mol Tg}]}$ $\frac{[\text{T}_4\text{-Jod}]}{[\text{Gesamtjod}]}$
natives Tg	6,5 (0,13%)	0,22 (10,2%)	0,18 (11,1%)
Jodierung mit 50 fach molarem Jodidüberschuß	61,6 (1,19%)	0,69 (3,4%)	1,17 (7,6%)
Jodierung mit 150 fach molarem Jodidüberschuß	116,9 (2,25%)	1,10 (2,8%)	1,88 (6,4%)

In **Kontrollexperimenten**, in denen das in vitro Jodierungssystem ohne Laktoperoxidase bzw. ohne Laktoperoxidase und ohne Glukoseoxidase angesetzt wurde, war keine Zunahme des Jod- und Jodthyronin-Gehaltes von Thyreoglobulin meßbar (Tab.VI). Auch die Jodidkonzentration im Inkubationsmedium blieb hierbei unverändert. Ebenso war bei Inkubationsansätzen ohne Jodid keine Veränderung des Jod- und insbesondere des Jodthyroningehaltes

nachweisbar (Tab.VI). Die Jodidkonzentration im Inkubationsmedium blieb unverändert, wenn kein Thyreoglobulin zugesetzt wurde (Tab.VI).

Tabelle VI

Kontrollexperimente zur
enzymatischen in vitro Jodierung von Thyreoglobulin (Tg) mit
Laktoperoxidase (LPO) und Glukoseoxidase (GOD)

	Gesamtjod- gehalt	T ₃ -Gehalt	T ₄ -Gehalt	Jodidkonzentra- tion im Inkuba- tionsmedium	
	$\frac{[\text{Atome Jod}]}{[\text{Molekül Tg}]}$	$\frac{[\text{mol T}_3]}{[\text{mol Tg}]}$	$\frac{[\text{mol T}_4]}{[\text{mol Tg}]}$	Jodid 0 min	$\mu\text{g/dl}$ 60 min
natives Tg	5,9	0,13	0,19	---	---
Jodierung mit 50 fach molarem Jodidüberschuß	67,1	0,63	1,25	498	48
Inkubationsansatz ohne LPO	5,9	0,15	0,14	520	500
Inkubationsansatz ohne LPO und ohne GOD	5,6	0,14	0,15	520	500
Inkubationsansatz ohne Jodid	5,7	0,15	0,15	---	---
Inkubationsansatz ohne Thyreoglobulin	-, -	-, --	-, --	480	450

Mit diesen Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, daß ohne die Enzyme Glukoseoxidase und Laktoperoxidase kein Einbau von Jod in Thyreoglobulinmoleküle erfolgte. Bei Inkubation von jodarmem Thyreoglobulin (5,9 Atome Jod/ Molekül Tg) mit Glukose, Glukoseoxidase und Lakto- peroxidase ohne Jodid geschah keine Neusynthese von

Jodthyroninen. Mit den Ansätzen ohne Thyreoglobulin wurde gezeigt, daß Jodid nicht in Nebenreaktionen (s.o.) verbraucht wurde.

Enzymatische in vitro Jodierung von vollständig desialisiertem Thyreoglobulin (dTg) erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die enzymatische in vitro Jodierung von nativem Thyreoglobulin (Tab.VII).

Tabelle VII

Jod- und Jodthyroningehalt von in vitro desialisiertem Thyreoglobulin (dTg) vor und nach enzymatischer in vitro Jodierung mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase

(Ergebnisse aus zwei Experimenten mit desialisiertem Thyreoglobulin aus zwei verschiedenen Präparationen)

	Gesamtjodgehalt	T ₃ -Gehalt	T ₄ -Gehalt
	$\frac{[\text{Atome Jod}]}{[\text{Molekül dTg}]}$	$\frac{[\text{mol T}_3]}{[\text{mol dTg}]}$	$\frac{[\text{mol T}_4]}{[\text{mol dTg}]}$
	$\frac{[\text{g I}]}{(\frac{[\text{g dTg}]}{1})}$	$\frac{[\text{T}_3\text{-Jod}]}{(\frac{[\text{Gesamtjod}]}{1})}$	$\frac{[\text{T}_4\text{-Jod}]}{(\frac{[\text{Gesamtjod}]}{1})}$
vor Jodierung	6,5 (0,13%)	0,20 (9,2%)	0,09 (5,5%)
Jodierung mit 150 fach molarem Jodidüberschuß	99,4 (1,91%)	1,43 (4,3%)	2,66 (10,7%)

Gegenüber nativem Thyreoglobulin fiel bei in vitro desialisiertem Thyreoglobulin der stets niedrigere Jod- und insbesondere T₄-Gehalt (0,09 mol T₄/mol Tg) auf (Tab.VII). Die enzymatische in vitro Desialisierung wurde in 0,05 M Acetatpuffer pH 5,5 durchgeführt (2.3.5.). Auch bei Inkubation von Thyreoglobulin in

0,05 M Acetatpuffer pH 5,5 ohne Neuraminidase wurde eine Abnahme des Jod- und Jodthyroningehaltes in dieser Größenordnung beobachtet. Eine mögliche Ursache für die Abnahme des Jod- und Jodthyroningehaltes könnte somit eine spontane Dehalogenierung von Thyroxinresten im sauren Milieu sein.

Bei vergleichbarer Zunahme des Gesamtjodgehaltes während der enzymatischen in vitro Jodierung wurde für desialisiertes Thyreoglobulin ein stärkerer Anstieg des Jodthyroningehaltes als für natives Thyreoglobulin gemessen (Tab.V und Tab.VII). Der prozentuale Anteil des in den Jodthyroninen enthaltenen Jods lag bei desialisiertem Thyreoglobulin vor und nach enzymatischer Jodierung mit 150 fach molarem Jodidüberschuß bei ca. 15% (Tab.VII). Dagegen wurde bei nativem Thyreoglobulin eine Abnahme des in Jodthyroninen gebundenen Jods von ca. 21% auf ca. 9% gefunden (Tab.V).

3.5. Isoelektrische Fokussierung von Thyreoglobulin

MIKROHETEROGENITÄT VON NATIVEM UND DESIALISIERTEM THYREOGLOBULIN

Nach den Kriterien von Disc- und SDS-Elektrophorese reines, natives Thyreoglobulin zeigte bei isoelektrischer Fokussierung auf 500 μ m Agarose-Dünnschichtgelen eine Mikroheterogenität von 6 deutlich getrennten Banden im Bereich von pH 4,20 - pH 4,60 (Abb.21). Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden lagen bei pH 4,20, pH 4,35, pH 4,40, pH 4,50, pH 4,55 und pH 4,60. Beim Probennachweis mit Coomassie Brilliant Blue waren die Fraktionen bei pH 4,40 und pH 4,50 breit, leicht unscharf begrenzt und intensiv gefärbt, die Fraktionen bei pH 4,35, pH 4,55 und pH 4,60 dagegen schmal, scharf begrenzt und weniger intensiv gefärbt. Bei 15 bis 30 μ g eingesetzter Probenmenge lag die Bande bei pH 4,20 im Bereich der Nachweisgrenze. Diese Bande war schmal, scharf begrenzt, wenig intensiv gefärbt und nicht immer nachweisbar (Abb.21).

Der isoelektrische Punkt von **enzymatisch in vitro vollständig desialisiertem Thyreoglobulin** war in den Bereich von pH 4,60 - pH 4,90 verschoben. Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Fraktionen lagen hier bei pH 4,60, pH 4,65, pH 4,75, pH 4,80, pH 4,85 und pH 4,90. Mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Banden bei pH 4,65 und pH 4,80 breit, leicht unscharf und intensiv dargestellt. Die restlichen Banden waren schmal, scharf begrenzt und wenig intensiv gefärbt. Die Bande bei pH 4,60 war bei 15 bis 30 μ g eingesetzter Probenmenge nicht immer nachweisbar (Abb.21).

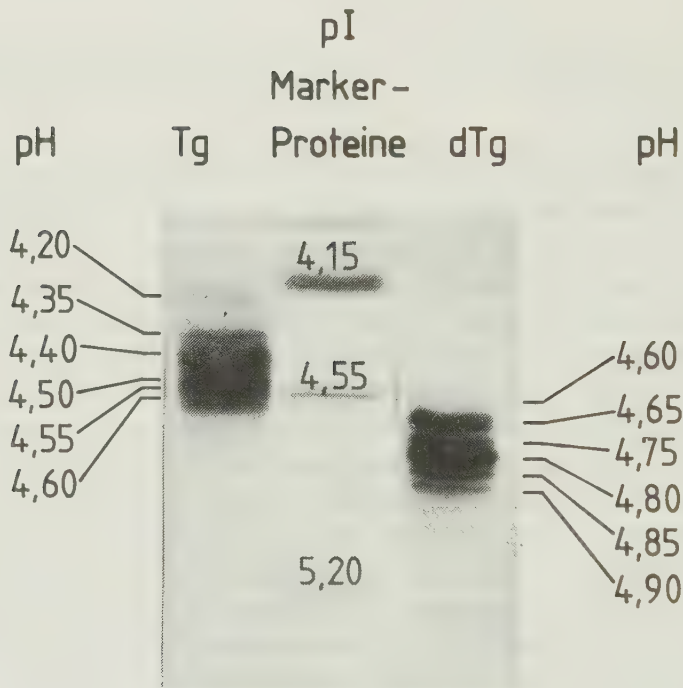


Abb.21: Mikroheterogenität von isoliertem humanem Thyreoglobulin bei isoelektrischer Fokussierung auf 0,5 mm Agarose-Dünnschichtgelen im Bereich von pH 4,0 -6,5: natives Thyreoglobulin (Tg) wurde aus einer diffusen Struma isoliert; dasselbe Thyreoglobulin wurde in vitro vollständig desialisiert (dTg); die Markerproteine für die isoelektrischen Punkte (pI) waren Glukoseoxidase mit pI 4,15, Trypsininhibitor aus Soya-bohnen mit pI 4,55 und β -Laktoglobulin mit pI 5,20.

MIKROHETEROGENITÄT VON THYREOGLOBULIN BEI VERSCHIEDENEN SCHILDDRÜSENERKRANKUNGEN

Die Mikroheterogenität von 6 Banden im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60 war bei allen untersuchten Thyreoglobulinfraktionen nachweisbar. Die verschiedenen Thyreoglobuline unterschieden sich lediglich in der Intensität der einzelnen Fraktionen der Mikroheterogenität. Für Thyreoglobuline, die aus diffusen Strumen, paranodulärem Schilddrüsengewebe oder Schilddrüsen bei M. Basedow isoliert wurden, konnte kein Zusammenhang zwischen den gefunden Unterschieden in der Mikroheterogenität und den zugrundeliegenden Schilddrüsenerkrankungen festgestellt werden. Bei Thyreoglobulin, das aus iso-

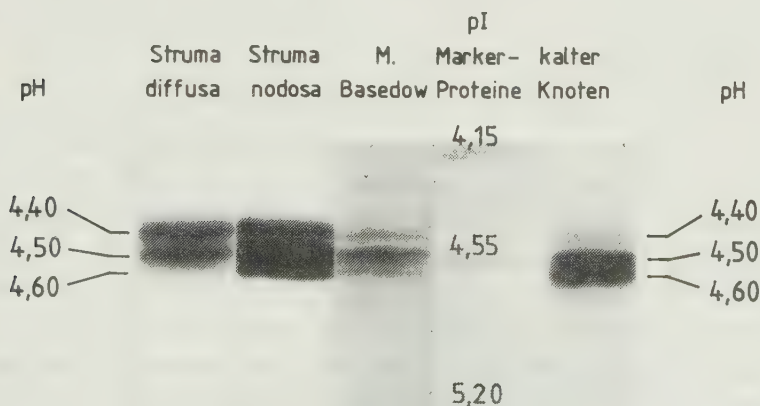


Abb.22: Mikroheterogenität von Thyreoglobulinen isoliert aus einer diffusen Struma, aus paranodulärem Schilddrüsengewebe, aus einer Schilddrüse bei M. Basedow und aus einem kalten Knoten

lierten kalten Knoten präpariert wurde, fiel auf, daß hier stets neben der Bande bei pH 4,50 auch die bei pH 4,55 und pH 4,60 intensiv gefärbt waren, während die Bande bei pH 4,40 weniger hervortrat und die Bande bei pH 4,20 bei der eingesetzten Probenmenge nie nachweisbar war (Abb.22).

MIKROHETEROGENITÄT VON **NATIVEM** THYREOGLOBULIN IN ABHÄNGIGKEIT VOM JODGEHALT

Die Intensität der einzelnen Banden der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin in der isoelektrischen Fokussierung war abhängig vom Jod- und Jodthyroningehalt der verschiedenen Thyreoglobulinpräparationen. Besonders deutlich war diese Beziehung den Diagrammen von laserdensitometrischen Auswertungen der gefärbten Mikroheterogenitätsmuster zu entnehmen (Abb.23).

Bei Thyreoglobulin mit einem Jodgehalt von 3,0 Atomen Jod/Molekül Tg färbten sich die Banden bei pH 4,60, pH 4,55 und pH 4,50 besonders intensiv, während die Bande bei pH 4,40 weniger hervortrat. Bereits bei einer geringfügigen Zunahme des Jodgehaltes auf 4,5 Atome Jod/Molekül Tg nahm die Intensität der Banden bei pH 4,60 und pH 4,55 deutlich ab, während gleichzeitig die Intensität der Banden bei pH 4,40 und 4,35 zunahm. Diese Verschiebung der höheren Farbintensität von den Fraktionen mit höheren isoelektrischen Punkten zu den Fraktionen mit niedrigeren isoelektrischen Punkten setzte sich bei Anstieg des Jodgehaltes auf 6,0 Atome Jod/Molekül Tg weiter fort.

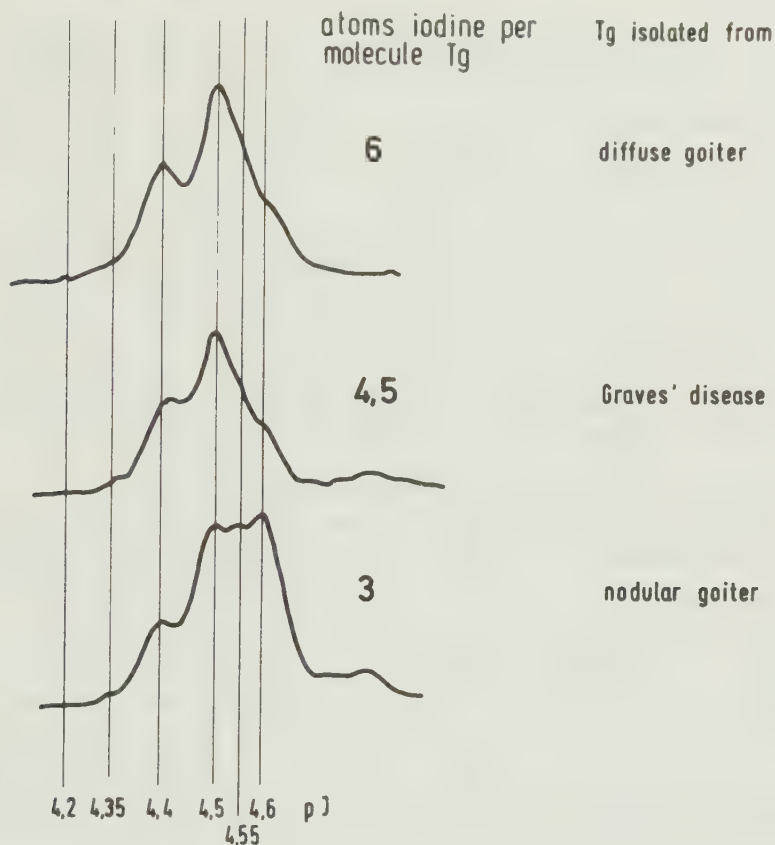


Abb.23: Diagramme der laserdensitometrischen Auswertungen der Coomassie Brilliant Blue gefärbten Mikroheterogenitäten von Thyreoglobulinen isoliert aus einer diffusen Struma mit 6 Atomen Jod/Molekül Tg, aus einer Schilddrüse bei M.Basedow mit 4,5 Atomen Jod/Molekül Tg und aus paranodulärem Schilddrüsengewebe mit 3,0 Atomen Jod/Molekül Tg: mit abnehmendem Jodgehalt der Thyreoglobuline verschiebt sich die Färbeintensität zu den Banden mit höheren isoelektrischen Punkten.

Die charakteristische Veränderung der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin in Abhängigkeit vom Jodgehalt konnte auch bei enzymatischer in vitro Jodierung von niedrig jodiertem Thyreoglobulin gezeigt werden. Bei einem anfänglichen Jodgehalt von 3 Atomen Jod/Molekül Tg färbte sich die Bande bei pH 4,60 am intensivsten, bei 5 Atomen Jod/Molekül Tg die Bande bei pH 4,50. Bei Anstieg des Jodgehaltes auf 8 Atome Jod/Molekül Tg nahmen die Banden bei pH 4,60 und pH 4,55 weiter ab, während die Banden bei pH 4,40 und pH 4,35 zunahmen. Bei 40 Atomen Jod/Molekül Tg war die Fraktion bei pH 4,40 am größten (Abb.24).

Die ausgeprägtesten Veränderungen der Intensitäten der einzelnen Banden erfolgten im Bereich von 2 bis 8 Atomen Jod/Molekül Tg (Abb.24). Dieser Sachverhalt konnte durch die prozentualen Anteile der einzelnen Banden an den integrierten Flächen unter den laserdensitometrischen Diagrammen quantitativ beschrieben werden (Abb.25). Die Bande bei pH 4,60 verringerte sich von 50,3% bei 2,3 Atomen Jod/Molekül Tg auf 8,1% bei 7,5 Atomen Jod/Molekül Tg. Im selben Bereich stieg der Anteil der Bande bei pH 4,50 von 15,8% auf 43,2% bei 5,9 Atomen Jod/Molekül Tg und fiel dann wieder auf 37,2%. Die Bande bei pH 4,40 steigerte ihren prozentualen Anteil von 5,7% auf 36,3%, die Bande bei pH 4,35 von ca. 0% auf 6,4%. Für die Fraktion bei pH 4,20 war keine Intensitätsveränderung in Abhängigkeit vom Jodgehalt nachweisbar. Der relative Anteil dieser Bande schwankte unabhängig von Jodgehalt zwischen 0% und 0,3% (Abb.25).

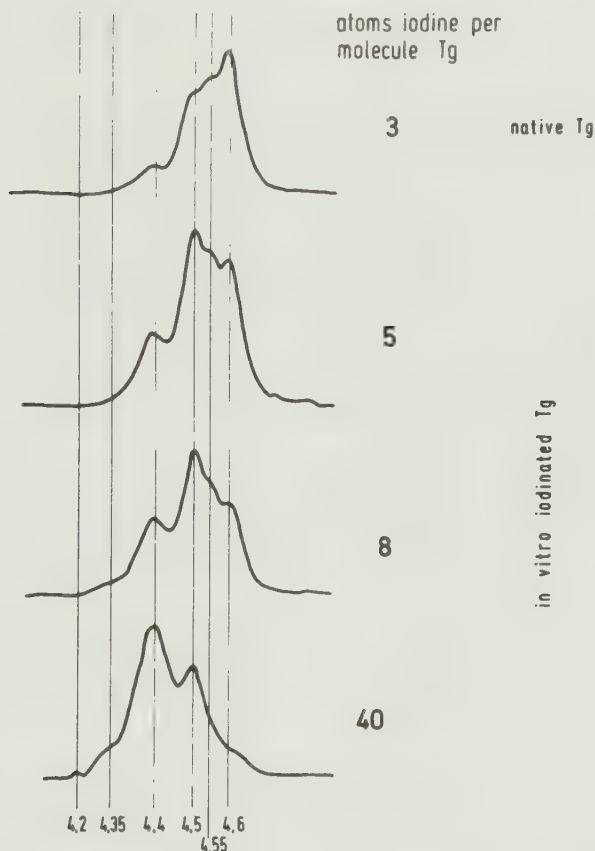


Abb. 24: Diagramme der laserdensitometrischen Auswertung Coomassie Brilliant Blue gefärbter isoelektrischer Fokussierungen nach enzymatischer in vitro Jodierung von Thyreoglobulin. Das untersuchte Thyreoglobulin wurde aus paranodulärem Schilddrüsengewebe isoliert und besaß nativ einen Jodgehalt von 3,0 Atomen Jod/Molekül Tg. Mit steigendem Jodgehalt verschob sich die maximale Färbeintensität von den Banden bei pH 4,60 und pH 4,55 zu den Banden bei pH 4,40 und pH 4,35.

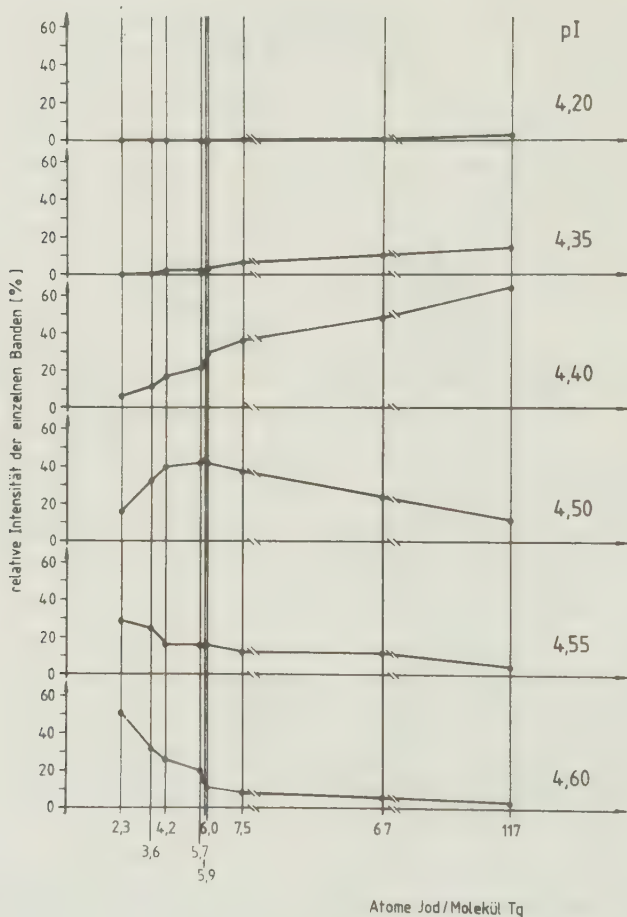


Abb.25: Relative Intensität der einzelnen Banden der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin in Abhängigkeit vom Jodgehalt. Die Werte errechneten sich aus den prozentualen Anteilen der einzelnen Banden an den Flächen, die unter Diagrammen laserdensitometrischer Auswertungen von Coomassie Brilliant Blue gefärbten isoelektrischen Fokussierung in vitro jodierter Thyreoglobuline durch Integration bestimmt wurden.

MIKROHETEROGENITÄT VON **DESIALISIERTEM** THYREOGLOBULIN
IN ABHÄNGIGKEIT VOM JODGEHALT

Auch nach enzymatischer in vitro Jodierung von vollständig desialisiertem Thyreoglobulin verschob sich die Intensität der einzelnen Fraktionen der Mikroheterogenität von den Banden mit höheren isoelektrischen Punkten zu den Banden mit niedrigeren isoelektrischen Punkten. Während sich die Intensität der Banden bei pH 4,90, pH 4,85 und pH 4,80 verringerte nahm gleichzeitig die Intensität der Banden bei pH 4,60 und pH 4,65 zu (Abb.26).

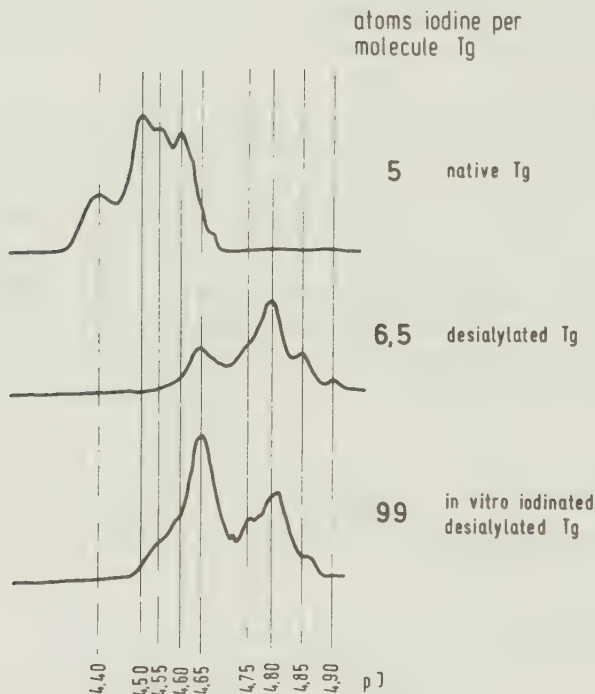


Abb.26: Diagramme laserdensitometrischer Auswertungen der Coomassie Brilliant Blue gefärbten isoelektrischen Fokussierungen von nativem Thyreoglobulin (Tg), enzymatisch in vitro vollständig desialisiertem Thyreoglobulin (dTg) und enzymatisch in vitro jodiertem desialisiertem Thyreoglobulin: Die Mikroheterogenität von vollständig desialisiertem Thyreoglobulin ist gegenüber der von nativem Thyreoglobulin zu höheren isoelektrischen Punkten versetzt. Nach enzymatischer in vitro Jodierung von desialisiertem Thyreoglobulin verschiebt sich die maximale Färbeintensität von den Banden bei pH 4,90, pH 4,85 und pH 4,80 zu den Banden bei pH 4,60 und pH 4,65.

3.6. Isoelektrische Fokussierung von endogen ¹³¹I markiertem Thyreoglobulin

In Seren von Patienten, die wegen dekompensierter autonomer Adenome oder M. Basedow mit ¹³¹I therapiert wurden, war nach Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung in 0,5 mm Agarose-Dünnschichtgelen im Bereich von pH 3,5 - 9,5 in der Autoradiographie eine Schwärzung im Bereich von pH 4,2 - 4,6 nachweisbar. Bei pH 4,20, insbesondere aber bei pH 4,40 und pH 4,50 war die Schwärzung zu scharf begrenzten Banden verdichtet. In einigen Fällen trat auch bei pH 4,65 und pH 4,80 eine bandenförmige Schwärzung auf (Abb.27).

Damit deckte sich der pH-Bereich der autoradiographischen Schwärzung mit dem pH-Bereich der Mikroheterogenität von aus Schilddrüsen isoliertem, reinem Thyreoglobulin. Die isoelektrischen Punkte der autoradiographischen Banden bei pH 4,40 und pH 4,50 entsprachen den im färberischen Nachweis mit Coomassie Brilliant Blue intensivsten Banden der Mikroheterogenität von isoliertem, reinem Thyreoglobulin. Die in der Autoradiographie vereinzelt aufgetretenen Banden bei pH 4,65 und pH 4,80 stimmten mit ihren isoelektrischen Punkten mit den im färberischen Nachweis mit Coomassie Brilliant Blue am deutlichsten hervortretenden Banden der Mikroheterogenität von desialisiertem Thyreoglobulin überein.

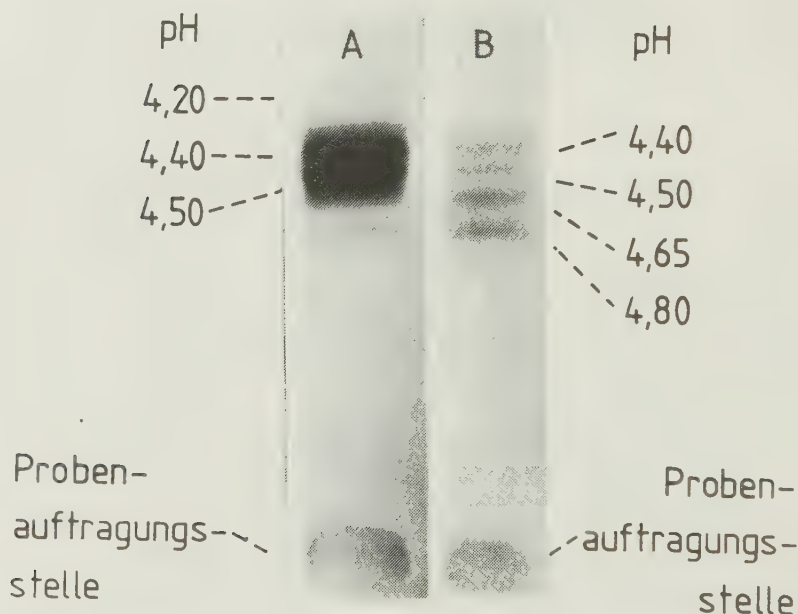


Abb.27: Autoradiographie von Seren ^{131}I therapierter Patienten nach Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung. Die Therapie erfolgte in beiden Fällen wegen eines dekompensierten autonomen Adenoms. Die isoelektrische Fokussierung wurde am Tag nach Gabe der ^{131}I -Dosis in 0,5 mm Agarose-Dünnschichtgelen im Bereich von pH 3,5 - 9,5 durchgeführt.

A: Die Schwärzung der Autoradiographie befindet sich im Bereich von pH 4,20 - 4,60. Die isoelektrischen Punkte der autoradiographischen Banden liegen bei pH 4,20, pH 4,40 und pH 4,50.

B: Die isoelektrischen Punkte der autoradiographischen Banden wurden mit pH 4,40, pH 4,50, pH 4,65 und pH 4,80 bestimmt.

4. Diskussion

Thyreoglobulin ist mit einem Molekulargewicht von 660 000 g/mol eines der größten Proteine des menschlichen Organismus. Zahlreiche Untersuchungen zum Thyreoglobulinmolekül haben sich mit der Aufklärung der Aminosäuresequenz (15,68,105,110) der Zusammensetzung der Kohlenhydratketten (4,120), der Proteinbiosynthese (22,90,128), der Jodtyrosin- und Jodthyroninsynthese (48,67,68,76,77,78,82,105,111), sowie der Identifizierung der Thyreoglobulin-Messenger-Ribonukleinsäure (22,82,83,129) und des Thyreoglobulin-Gens (7,13,17,18,95,96,100,130) befaßt. Dagegen gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang zwischen Veränderungen des Thyreoglobulinmoleküls und Stoffwechselstörungen der Schilddrüse beim Menschen nachgewiesen oder nahegelegt haben (34,70,84,86,87,117). Mit einer Ursache hierfür war sicher das Fehlen einer geeigneten Methode, die den Nachweis geringfügiger Veränderungen im chemischen und räumlichen Aufbau auch bei einem Molekül von 660 000 g/mol Molekulargewicht ermöglicht.

Durch isoelektrische Fokussierung in 500 µm Agarosedünnschichtgelen konnte für aus menschlichen Schilddrüsen isoliertes, reines Thyreoglobulin eine Mikroheterogenität von 6 Banden charakterisiert werden. Damit wurde für humanes Thyreoglobulin eine physikochemische Konstante festgelegt, die kleinste Veränderungen der chemischen Zusammensetzung oder der räumlichen Struktur äußerst empfindlich anzeigt. Darüberhinaus wurden Beeinflussungen der gefundenen Mikroheterogenität durch unterschiedlichen N-Acetyl-Neuraminsäuregehalt oder unterschiedlichen Jod- und Jodthyroningehalt beschrie-

ben. Hiermit konnte der Einfluß zweier zentraler physiologischer Veränderungen des Thyreoglobulinmoleküls auf die Mikroheterogenität in der isoelektrischen Fokussierung erfaßt werden (9,47).

ISOLIERUNG VON THYREOGLOBULIN

Das angewandte Verfahren zur Isolierung von Thyreoglobulin aus menschlichen Schilddrüsen ermöglichte die einfache Gewinnung größerer Mengen humanen Thyreoglobulins, welches in gefriergetrocknetem Zustand bei -20°C stabil war und auch nach längerer Lagerung keine Veränderungen durch Verunreinigung mit proteolytischen Enzymen aufwies. Die Elution des Schilddrüsenkolloids aus 300 bis 500 μm dicken Schilddrüsen Gewebeschnitten verhinderte die Freisetzung großer Mengen proteolytischer Enzyme aus zerstörten Schilddrüsenzellen, wie es bei einer Homogenisierung des Schilddrüsen Gewebes geschehen wäre (67). Eine Proteindegradation durch kleine Mengen freigesetzter proteolytischer Enzyme wurde durch einen Proteaseinhibitor verhindert. Aus den Eluaten der Schilddrüsen Gewebeschnitte konnte nach den Kriterien von Disc- und SDS-Elektrophorese reines, humanes Thyreoglobulin in einem einzigen Chromatographieschritt auf einem Agarose/Acrylamidgel gewonnen werden.

REINHEIT DES ISOLIERTEN THYREOGLOBULINS

Die Reinheit des isolierten Thyreoglobulins wurde mit elektrophoretischen Verfahren nachgewiesen. Das für die Gewinnung des Thyreoglobulins verwendete humane Schilddrüsen Gewebe stammte aus einem Jodmangel-Endemiegebiet. So wurde in dem isolierten Thyreoglobulin ein Jodgehalt zwischen 3 und 8 Atomen Jod/Molekül Thyreoglobulin, entsprechend einem Jodanteil von 0,06 bis 0,15 Ge-

wichtsprozent, gemessen. Da niedrig jodiertes Thyreoglobulin leicht in seine beiden Untereinheiten dissoziiert (1), galten für das präparierte Thyreoglobulin in der Disc-Elektrophorese als Reinheitskriterium eine langsam wandernde, hochmolekulare Hauptfraktion und eine schneller wandernde, niedermolekularere, kleinere Fraktion. Wie mit Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen gezeigt werden konnte, handelte es sich bei der Hauptfraktion um vollständiges 19S Thyreoglobulin, bei der niedermolekulareren Fraktion um die Thyreoglobulinuntereinheit, sogenanntes 12S Thyreoglobulin. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde durch eine einzelne homogene Bande mit einem Molekulargewicht von 330 000 g/mol in der SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen bestätigt. Bei Molekulargewichtsbestimmung in Polyacrylamid-Gradientengelen wurde im Vergleich mit Referenzproteinen für die Hauptfraktion ein Molekulargewicht von 690 000 g/mol, für die niedermolekularere Fraktion ein Molekulargewicht von 470 000 g/mol bestimmt. Mögliche Ursache für das zu hoch bestimmte Molekulargewicht der Thyreoglobulinuntereinheit ist, daß das 12S Thyreoglobulin eine aufgefaltete Tertiärstruktur besaß und damit nicht mehr den für globuläre Proteine definierten Bedingungen der Molekulargewichtsbestimmung in Polyacrylamid-Gradientengelen entspricht (75).

IN VITRO JODIERUNG VON THYREOGLOBULIN

Um auch Thyreoglobulin mit einem höheren Jod- und Jodthyroningehalt in der isoelektrischen Fokussierung untersuchen zu können, wurde das präparierte, jodarme Thyreoglobulin in vitro mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase jodiert. Bei niedrig jodiertem Thyreoglobulin (3 - 8 Atome Jod/Molekül Tg) lag der molare T_3 -Gehalt

mit 0,2 - 0,4 mol T_3 /mol Tg höher als der molare T_4 -Gehalt mit 0,1 - 0,3 mol T_4 /mol Tg. Durch die enzymatische in vitro Jodierung konnte ein Anstieg des Jod- und Jodthyroningehaltes auf 117 Atome Jod/Molekül Thyreoglobulin (2,25%), 1,10 mol T_3 /mol Thyreoglobulin und 1,88 mol T_4 /mol Thyreoglobulin erreicht werden. Mit zunehmendem Jodgehalt stieg also der molare T_4 -Gehalt deutlich mehr als der molare T_3 -Gehalt. Entsprechend Befunden aus in vivo Analysen nahm auch bei der enzymatischen in vitro Jodierung mit zunehmendem Jodgehalt der relative Anteil des in den Jodthyroninen inkorporierten Jods ab (81). Hieraus konnte geschlossen werden, daß die Synthese von Jodtyrosinen und Jodthyroninen bei in vitro Jodierung mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase analog der Hormonsynthese in vivo erfolgte: Gesamtjod- und Jodthyroningehalt stehen in keiner proportionalen Beziehung. Die Hormonsynthese kann bereits bei relativ niedrigem Gesamtjodgehalt (3 - 10 Atome Jod/mol Tg) erfolgen, bei sehr niedrigem Jodgehalt überwiegend in Form von T_3 . Bei höherem Jodgehalt wird Jod in Jodtyrosinen gespeichert und es wird relativ wenig neues Hormon, überwiegend in Form von T_4 , gebildet.

ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG VON NATIVEM THYREOGLOBULIN

Die Auftrennung von reinem, humanem Thyreoglobulin durch isoelektrische Fokussierung in 500 μ m Agarosedünnschichtgelen ergab eine **Mikroheterogenität von 6 Banden** im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60. Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden lagen bei pH 4,20, pH 4,35, pH 4,40, pH 4,50, pH 4,55 und pH 4,60. Bei färberischem Nachweis mit Coomassie Brilliant Blue waren die Banden bei pH 4,40 und pH 4,50 am intensivsten. Bei isoelektrischer Fokussierung in 500 μ m Polyacrylamidgelen (T = 5,0%, C = 3,0%) war

wegen der geringeren Porenweite der Polyacrylamidgele eine Auftrennung in scharfe Banden nicht möglich.

Die Färbungsintensität der einzelnen Banden der **Mikroheterogenität** wurde durch unterschiedlichen Jod- und Jodthyroningehalt beeinflusst. Mit steigendem Jodierungsgrad von Thyreoglobulin erfolgte eine Abnahme der Banden bei pH 4,60 und pH 4,55 bei gleichzeitiger Zunahme der Banden bei pH 4,40 und pH 4,35. Diese Veränderungen der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin waren im Bereich von 3 bis 8 Atomen Jod / Molekül Thyreoglobulin am ausgeprägtesten. Da die Intensität der Banden bei pH 4,55 und pH 4,60 hier sehr rasch abnahm, enthalten diese beiden Banden vermutlich Thyreoglobulin, in dem unter Erniedrigung des isoelektrischen Punktes bevorzugt die Synthese von Jodtyrosinen und Jodthyroninen erfolgt. Bei weiter zunehmendem Jod- und Jodthyroningehalt veränderte sich die Mikroheterogenität von Thyreoglobulin nur noch geringfügig in der beschriebenen Weise. Für die Bande bei pH 4,20 waren keine Veränderungen bei unterschiedlichem Jodgehalt zu beobachten. Somit stellte sich die Frage, ob es sich bei dieser Bande wirklich um Thyreoglobulin oder eine mögliche Verunreinigung handelte. Mit dem autoradiographischen Nachweis der Bande bei pH 4,20 in der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin aus Seren ¹³¹I-therapierter Patienten konnte gezeigt werden, daß die Bande bei pH 4,20 ein Jodoprotein, also mit großer Wahrscheinlichkeit Thyreoglobulin war.

Untersuchungen von Lejeune, Marriq, Rolland und Lissitzky (67,77,78), daß Thyreoglobulin Peptidsequenzen mit unterschiedlicher Affinität für die Hormonsynthese enthält, Sequenzen, in denen bei sehr niedrigem Jodgehalt Jodthyronine synthetisiert werden, und Sequenzen, in denen erst bei höherem Jodgehalt eine

Hormonsynthese stattfindet, unterstützen die Vermutung, daß die gefundenen Veränderungen der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin bei unterschiedlichem Jodgehalt auf Veränderungen des Thyreoglobulinmoleküls bei der Jodtyrosin- und Jodthyroninsynthese zurückzuführen sind.

Als mögliche Ursachen der Erniedrigung des isoelektrischen Punktes von Thyreoglobulin während der Synthese von Jodtyrosinen und Jodthyroninen können die sehr niedrigen pK Werte der phenolischen Hydroxylgruppen von Dijodtyrosin und Thyroxin (127) oder eine Veränderung der räumlichen Struktur des Thyreoglobulinmoleküls diskutiert werden. So könnten bei Veränderung der Tertiärstruktur dissoziierbare Gruppen, die im Inneren des Thyreoglobulinmoleküls verborgen waren, an die Oberfläche treten und/oder umgekehrt. Verschiedene Arbeiten weisen auf Veränderungen der Tertiärstruktur von Thyreoglobulin während der Hormonsynthese hin. So haben Untersuchungen von Lejeune, Marriq, Rolland und Lisitzky (67,77,78) gezeigt, daß diejenigen Peptidsequenzen des Thyreoglobulinmoleküls, in denen die Hormonsynthese abläuft, bei höherem Jodierungsgrad leichter von proteolytischen Enzymen aus dem Thyreoglobulinmolekül herausgelöst werden als bei niedrigem Jodgehalt. Berg et al. (10,11,12) beobachteten in elektronenmikroskopischen Studien, daß Thyreoglobulin in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann. Jodarmes Thyreoglobulin besaß eine poröse, zylindrische Struktur, während höher jodiertes Thyreoglobulin eine kompaktere, ovoide Struktur aufwies. Allerdings wiesen Berg et al. darauf hin, daß die Konformationsänderung von der zylindrischen zur ovoiden Struktur während in vitro Jodierung auch durch oxidative Vorgänge bei alleiniger Inkubation mit Glukose und Glukoseoxidase auftreten können (11). In eigenen Kontrollexperimenten zur enzymatischen in vitro Jodierung, in denen Thyreoglobulin nur mit Glukose und

Glukoseoxidase inkubiert wurde, waren dagegen keine Veränderungen der Mikroheterogenität zu beobachten. Darüberhinaus waren die charakteristischen Unterschiede in der Mikroheterogenität auch bei verschiedenen, nativen Thyreoglobulinen mit unterschiedlichem Jod- und Jodthyroningehalt zu beobachten.

Trotz der typischen Veränderungen der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin durch unterschiedlichen Jod- und Jodthyroningehalt, schien es fraglich, ob unterschiedlicher Jod- und Jodthyroningehalt die Ursache der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin war. Sehr niedrig jodiertes Thyreoglobulin mit einem Jodgehalt von 2 Atomen Jod/Molekül Thyreoglobulin besaß ebenso wie sehr hoch jodiertes Thyreoglobulin mit einem Jodgehalt von 117 Atomen Jod/Molekül Thyreoglobulin eine Mikroheterogenität von 6 klar getrennten Banden im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60. Für die Bande bei pH 4,20 waren keine vom Jodgehalt abhängigen Intensitätsveränderungen zu beobachten. Möglicherweise sind Unterschiede in der Zusammensetzung der Polypeptidkette von Thyreoglobulin, wie sie von Dunn und Ray (33,35) beschrieben wurden, für die Entstehung der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin verantwortlich. Schließlich war zu beachten, daß das native, jodarme Thyreoglobulin stets 12S Thyreoglobulin-Untereinheiten enthielt, die möglicherweise an der Entstehung der Mikroheterogenität beteiligt waren.

ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG VON IN VITRO DESIALISIERTEM THYREOGLOBULIN

Da Thyreoglobulin ein Glykoprotein ist (4), und mehrere Untersuchungen auf eine Bedeutung von **N-Acetyl-Neuraminsäure** für die Exozytose von neu synthetisiertem Thyreoglobulin in die Schilddrüsenfollikel und für die

Endozytose von jodiertem Thyreoglobulin aus den Schilddrüsenfollikeln in die Thyreozyten zur Hormonfreisetzung hinweisen (70,87,88) wurde der Einfluß des N-Acetyl-Neuraminsäuregehaltes auf die Mikroheterogenität von Thyreoglobulin in der isoelektrischen Fokussierung untersucht. Für natives Thyreoglobulin wurde ein N-Acetyl-Neuraminsäure- (NANA-) Gehalt von 26 mol NANA/mol Thyreoglobulin bestimmt, was mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen übereinstimmt (90). Nach vollständiger, enzymatischer in vitro Desialisierung von Thyreoglobulin wurde eine Verschiebung der Mikroheterogenität um 0,25 bis 0,30 pH-Einheiten in den Bereich von pH 4,60 bis pH 4,90 beobachtet. Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden lagen bei pH 4,60, pH 4,65, pH 4,75, pH 4,80, pH 4,85 und pH 4,90. Beim färberischen Nachweis mit Coomassie Brilliant Blue waren die Banden bei pH 4,65 und pH 4,80 am intensivsten. Eine Verringerung der Anzahl der Banden der Mikroheterogenität, wie es bei Thyroxin- bindendem Globulin der Fall ist (44), erfolgte nicht. Wie bei nativem Thyreoglobulin war bei desialisiertem Thyreoglobulin mit zunehmendem Jodgehalt eine Intensitätsabnahme der Banden mit höheren isoelektrischen Punkten (pH 4,90, pH 4,85) zu beobachten, während sich gleichzeitig die Banden mit niedrigeren isoelektrischen Punkten (pH 4,65, pH 4,60) stärker färbten. Damit kommt ein unterschiedlicher N-Acetyl-Neuraminsäuregehalt als Ursache der Mikroheterogenität von Thyreoglobulin nicht in Frage.

MIKROHETEROGENITÄT VON THYREOGLOBULIN BEI VERSCHIEDENEN SCHILDDRÜSENERKRANKUNGEN

Humanes Thyreoglobulin wurde aus diffusen Jodmangelstrumen, aus paranodulärem Gewebe nodöser Strumen, aus Schilddrüsen bei M.Basedow und aus kalten Knoten iso-

liert. Bei allen diesen Schilddrüsenerkrankungen wurde für die präparierten, reinen Thyreoglobuline eine Mikroheterogenität von 6 Banden im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60 gefunden. Unterschiede zwischen den verschiedenen Thyreoglobulinen bestanden lediglich in der jeweiligen Intensitätsverteilung des Mikroheterogenitätsmusters. Aber für keine der Schilddrüsenerkrankungen konnte eine typische Intensitätsverteilung gezeigt werden. Alle Unterschiede in der Intensität der einzelnen Banden ließen sich durch den jeweiligen Jod- und Jodthyroningehalt erklären. Lediglich Thyreoglobulin, das aus kalten Knoten isoliert wurde, wies mit Betonung der Banden bei pH 4,60 und pH 4,55 stets ein für extrem jodarmes Thyreoglobulin typisches Mikroheterogenitätsmuster auf.

Eine unterschiedliche Mikroheterogenität für Thyreoglobulin aus normalen Schilddrüsen oder diffusen Strumen, und für Thyreoglobulin aus einer Schilddrüse bei M.Basedow wurde dagegen von Massi und Crivelli beschrieben (79). Auch sie gaben für normales Thyreoglobulin eine Mikroheterogenität im Bereich von pH 4,10 bis pH 4,60 an. Die Mikroheterogenität des Thyreoglobulins aus der Schilddrüse bei M.Basedow lag hingegen im Bereich von pH 5,10 bis pH 5,40. Das geringe Auflösungsvermögen der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamid-Dünnschichtgelen ermöglichte keine nähere Charakterisierung der Mikroheterogenitäten durch einzelne Banden mit definierten isoelektrischen Punkten. Ferner wurden weder ein unterschiedlicher N-Acetyl-Neuraminsäure-Gehalt, noch ein unterschiedlicher Jod- und Jodthyroningehalt berücksichtigt. Auch handelte sich es in dieser Arbeit um die Untersuchung eines Einzelfalls.

ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG VON THYREOGLOBULIN IN SEREN

In Seren von Patienten, die wegen autonomer Adenome oder M. Basedow mit ^{131}I therapiert wurden, konnte nach Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung in der Autoradiographie eine Schwärzung im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60 nachgewiesen werden. Bei pH 4,20, insbesondere aber bei pH 4,40 und pH 4,50 war die autoradiographische Schwärzung zu scharfen Banden verdichtet. Damit stimmte die Mikroheterogenität von in vivo bei Radiojodtherapie in die Blutbahn freigesetztem Thyreoglobulin mit der Mikroheterogenität von aus Schilddrüsen isoliertem und gereinigtem Thyreoglobulin überein. In einigen Fällen traten in den Autoradiographien auch Banden bei pH 4,65 und pH 4,80, den isoelektrischen Punkten der Hauptbanden von desialisiertem Thyreoglobulin, auf.

Die Charakterisierung von humanem Thyreoglobulin durch seinen isoelektrischen Punkt, sowie die Beschreibung von Einflüssen unterschiedlichen N-Acetyl-Neuraminsäuregehaltes oder unterschiedlichen Jod- und Jodthyroningehaltes auf diese physikochemische Konstante ermöglichen es, bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen Veränderungen des Thyreoglobulinmoleküls in seiner chemischen Zusammensetzung oder in seiner räumlichen Konfiguration nachzuweisen. Mit hochempfindlichen Nachweistechiken wird auch die Untersuchung von im Serum zirkulierendem Thyreoglobulin möglich sein (46). Für alle diese Zwecke kann isoelektrische Fokussierung von Thyreoglobulin in Agarose-Dünnschichtgelen eine einfach durchzuführende, gut reproduzierbare und hochsensitive Methode sein.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich der chemische Aufbau von Thyreoglobulin bei verschiedenen Erkrankungen und Funktionsstörungen der Schilddrüse verändert. Als Methode zum Nachweis chemischer Strukturveränderungen wurde die Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch isoelektrische Fokussierung eingesetzt.

Humanes Thyreoglobulin wurde aus Gewebeschnitten von Operationsmaterial diffuser Jodmangelstrumen, nodöser Strumen, Schilddrüsen bei M.Basedow und kalten Knoten eluiert und durch Chromatographie in einem Agarose/Acrylamidgel gereinigt.

Die Reinheit des isolierten, humanen Thyreoglobulins konnte mit zwei Banden in der Disc-Elektrophorese (19S Thyreoglobulin und 12S Thyreoglobulin), sowie mit einer homogenen Banden in der SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen gezeigt werden. In der Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese wurde für das isolierte Thyreoglobulin ein Molekulargewicht von 690 000 g/mol bestimmt.

Der Jodgehalt des präparierten Thyreoglobulins lag zwischen 3 und 8 Atomen Jod/Molekül Thyreoglobulin. Ein Jodthyroningehalt von 0,1 bis 0,4 mol T_3 /mol Thyreoglo-

bulin und 0,1 bis 0,3 mol T_4 /mol Thyreoglobulin wurden bestimmt.

Durch enzymatische in vitro Jodierung mit Laktoperoxidase und Glukoseoxidase konnte ein maximaler Jodgehalt von 117 Atomen Jod/Molekül Thyreoglobulin und ein Jodthyroningehalt von 1,10 mol T_3 /mol Thyreoglobulin bzw. 1,88 mol T_4 /mol Thyreoglobulin erreicht werden.

Bei Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung in Agarose-Dünnschichtgelen verhielt sich das reine, humane Thyreoglobulin bezüglich des isoelektrischen Punktes heterogen. Im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60 waren 6 einzelne Banden mit den isoelektrischen Punkten pH 4,20, pH 4,35, pH 4,40, pH 4,50, pH 4,55 und pH 4,60 abzugrenzen.

Die Intensität der einzelnen Banden der Mikroheterogenität hing vom Jod- und Jodthyroningehalt ab. Mit zunehmendem Jodgehalt nahm die Intensität der Banden mit höheren isoelektrischen Punkten ab, während sich gleichzeitig die Banden mit niedrigeren isoelektrischen Punkten stärker färbten. Die Intensitätsverschiebungen traten besonders im Bereich von 3 bis 8 Atomen Jod/Molekül Thyreoglobulin auf.

Vollständig desialisiertes Thyreoglobulin besaß eine Mikroheterogenität von 6 einzelnen Banden im Bereich von pH 4,60 bis pH 4,90. Die isoelektrischen Punkte der einzelnen Banden wurden mit pH 4,60, pH 4,65, pH 4,75, pH 4,80, pH 4,85 und pH 4,90 bestimmt. Die Intensitätsverteilung zwischen den einzelnen Banden hing wie bei nativem Thyreoglobulin vom Jod- und Jodthyroningehalt ab.

Natives Thyreoglobulin zeigte in allen Präparationen aus diffusen Jodmangelstrumen, paranodulärem Gewebe nodöser Strumen, Schilddrüsen bei M.Basedow und kalten Knoten die beschriebene Mikroheterogenität von 6 Banden im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60. Differenzen unter den einzelnen Thyreoglobulinen bestanden lediglich in der Intensitätsverteilung zwischen den einzelnen Banden und konnten mit unterschiedlichem Jod- und Jodthyronin-gehalt erklärt werden. Für keine der untersuchten Schilddrüsenerkrankung konnte ein typisches Thyreoglobulin-Mikroheterogenitätsmuster festgestellt werden.

Im Serum zirkulierendes Thyreoglobulin konnte bei Patienten, die wegen autonomer Adenome oder M.Basedow mit ^{131}I therapiert wurden, nach Auftrennung durch isoelektrische Fokussierung in der Autoradiographie untersucht werden. Auch für dieses während der Radiojodtherapie in die Blutbahn freigesetzte Thyreoglobulin wurde eine Mikroheterogenität im Bereich von pH 4,20 bis pH 4,60 gefunden.

6. Literatur:

- (1) Andreoli M., Sena L., Edelhoeh H., Salvatore G.
(1969)
The noncovalent subunit structure of human
thyroglobulin
Arch. Biochem. Biophys. 134, 242-248
- (2) Andrews, P. (1965)
The gel filtration behaviour of proteins related
to their molecular weights over a wide range.
Biochem. J. 96, 595-606
- (3) Andros G., Wollman S.H. (1967)
Am. J. Physiol 213, 198-208
- (4) Arima T., Spiro M.J., Spiro R.G. (1972)
Studies on the carbohydrate units of thyroglobu-
lin. Evaluation of their microheterogeneity in
the human and calf proteins
J. Biol. Chem. 247, 1825-1835
- (5) Arima T., Spiro R.G. (1972)
Studies on the carbohydrate units of thyroglobu-
lin. Structure of the mannose-N-acetylglucosamine
unit (Unit A) of the human and calf proteins
J. Biol. Chem. 247, 1836-1848
- (6) Arnott. S., Fulmer A., Scott W.E. et al. (1974)
The agarose double helix and its function in
agarose gel structure
J. Mol. Biol 90, 269-284

-
- (7) Avvedimento V.E., Musti A.M., Cocozza S.,
di Lauro R. (1983)
The 3'end of the rat thyroglobulin gene
Ann. Endocrinol. (Paris) 44, 30A
- (8) Bark J.E., Harris M.J., Firth M. (1976)
Typing of the common phosphoglucomutase variants
using isoelectric focusing - a new interpreta-
tion of the phosphoglucomutase system
J. Forens. Sci. Soc. 16, 115-120
- (9) Bechtner G., Gärtner R., Greil W., Horn K. (1983)
Microheterogeneity of thyroglobulin reflects
different stages of iodination and content of
N-acetyl-neuraminic acid in different thyroid
diseases
Acta Endocrinol. (Kbh.), Suppl. 253, 122
- (10) Berg G., Ekholm R. (1975)
Electron microscopy of low iodinated
thyroglobulin molecules
Biochim. Biophys. Acta 386, 422-431
- (11) Berg G., Björkman U., Ekholm R. (1980)
Conformational change of the thyroglobulin
molecule induced by oxidation in vitro
Mol. Cell. Endocrinol. 17, 139-144
- (12) Berg G., Björkman U., Ekholm R. (1980)
The structure of newly synthesized intracellular
thyroglobulin molecules
Mol. Cell. Endocrinol. 20, 87-98
- (13) Bergé-Lefranc J.L., Carouzou G., Malthiéry Y.,
Perrin F., Jarry B., Lissitzky S. (1981)
Cloning of four DNA fragments complementary to
human thyroglobulin messenger RNA
Eur. J. Biochem. 120, 1

-
- (14) Binnerts W.T., Das H.A.(1974)
Determination of Iodine in Biological Material
Meth. Biochem. Anal. 22, 251-306
- (15) Bismuth J., Rolland M., Lissitzky S. (1966)
Composition en acides aminés de thyroglobuline
provenant de sujets euthyroidiens et goitreux
Acta Endocrinol (Kbh.) 53, 297
- (16) Brewer J.M. (1967)
Artifact produced in disc-electrophoresis by
ammonium persulfate
Science 156, 256-257
- (17) Brocas H., Cristophe D., Pohl V., Vassart G.
(1982)
Cloning of human thyroglobulin complementary DNA
FEBS Lett. 137, 189
- (18) Cabrer B., Bergé-LeFranc J.L., Brocas H.,
Cartouzou G., Pohl V., Malthiery Y. (1983)
Construction of a restriction map covering 95% of
human thyroglobulin structural gene
Ann. Endocrinol. (Paris) 44, 52
- (19) Cammann K. (1977)
Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden
Anleitungen für die chemische
Laboratoriumspraxis, Band XIII
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- (20) Chang C.N., Blobel G., Model P. (1978)
Detection of prokaryotic signal peptidase in an
Escherichia coli membrane fraction: Endoproteo-
lytic cleavage of nascent fl pre-coat protein
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 361-365

-
- (21) Chapuis-Cellier C., Francina A., Arnaud P.(1980)
Immunofixation after electrofocusing: applica-
tion to the study of the microheterogeneity and
polymorphism of serum proteins
in: Electrophoresis '79 (Radola B.J. ed.),
Walter de Gruyter, Berlin-New York 1980, 711-725
- (22) Chebath J., Chabaud O., Becarevic A.,
Carouzou G., Lissitzky S. (1977)
Thyroglobulin mRNA-translation in vitro
Eur. J. Biochem. 77, 243
- (23) Chrambach A., Doerr P., Finlayson G.R., Miles
L.E.M., Sherins R., Rodbard D. (1973)
Isoelectric focusing: A. Theory and Methodology
(Part I)
Instability of pH gradients formed by isoelec-
tric focusing in polyacrylamide gel
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 44-64
- (24) Consiglio E., Salvatore G., Rall J.E., Kohn L.D.
(1979)
Thyroglobulin interactions with thyroid plasma
membranes
J. Biol. Chem. 254 (12), 5065-5076
- (25) de Crombrugge B., Pitt-Rivers R., Edelhoch H.
(1966)
The properties of thyroglobulin
XI. The reduction of the disulfide bonds
J. Biol. Chem. 241, 2766-2773
- (26) Davis B.J., Ornstein L. (1959)
A new high resolution electrophoresis method.
Delivered at The Society for the Study of Blood
in The New York Academy of Medicine, March 24,

-
- (27) Determann, H., Michel, W. (1966)
The correlation between molecular weight and
elution behaviour in the gel chromatography of
proteins.
J. Chromatogr. 25, 303-313
- (28) Dolling C.E., Good B.F. (1976)
Congenital goitre in sheep: Isolation of the
iodoproteins which replace thyroglobulin
J. Endocrinol. 71, 179-192
- (29) Dubravcic M. (1955)
Determination of Iodine in Natural Waters (Sodium
Chloride as a Reagent in the Catalytic Reduction
of Ceric Ions).
Analyst 80, p. 295
- (30) Dubravcic M. (1956)
Z. Anal. Chem. 149, p. 393
- (31) Duckworth M., Yaphe W. (1971)
Preparation of agarose by fractionation from the
spectrum of polysaccharides in agar
Anal. Biochem 44, 636-641
- (32) Dunn J.T. (1970)
The amino acid neighbors of thyroxine in
thyroglobulin
J. Biol. Chem. 245, 5954-5961
- (33) Dunn J.R., Ray S.C. (1975)
Changes in the structure of thyroglobulin
following the administration of thyroid-
stimulating hormone
J. Biol. Chem. 250, 5801-5807

-
- (34) Dunn J.T., Dunn A.D., Heppner Jr. D.G., Kim P.S. (1981)
A discrete thyroxine-rich iodopeptide of 20.000 daltons from rabbit thyroglobulin
J.Biol. Chem. 256, 942-947
- (35) Dunn J.R., Ray S.C. (1978)
Variations in the structure of thyroglobulins form normal and goitrous human thyroids
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47, 861-869
- (36) Edelhoch H. (1962)
The properties of thyroglobulin
VIII. The iodination of thyroglobulin
J. Biol. Chem. 237, 2778-2787
- (37) Edelhoch H. (1965)
The structure of thyroglobulin and its role in iodination
Recent Prog. Hormone Res. 21, 1-31
- (38) Edelhoch H., Carlomagno M.S., Salvatore G. (1969)
Iodine and the structure of thyroglobulin
Arch. Biochem Biophys. 134, 264-265
- (39) Ekholm R., Strandberg U. (1967)
Thyroglobulin biosynthesis in the rat thyroid
J. Ultrastruct. Tes. 20, 103-110
- (40) Ekholm R. (1981)
Iodination of thyroglobulin: An intracellular or extracellular process?
in: Elsevier/North-Holland Scientific Publishers, Ltd., 141-163
- (41) Esposito J., Obijeski J.F. (1976)
Preparative Biochemistry, 6, 431-442

-
- (42) Gärtner R., Horn K., Pickardt R.C. (1980)
Improvement of the diagnostic validity of the
thyroglobulin radioimmunoassay
Acta Endocrinol. (Copenh.), Suppl. 234, 30-31
- (43) Gärtner R., Kewenig M., Horn K., Scriba P.C.
(1980)
A New Principle of Thyroxine (T_4) and Triiodo-
thyronine (T_3) Radioimmunoassay in Unextracted
Serum Using Antisera with Binding Optima at
Extreme pH Ranges
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 571-577
- (44) Gärtner R., Henze R., Horn K., Pickardt C.R.,
Scriba P.C. (1981)
Thyroxine-binding-globulin: investigation of
microheterogeneity
J. Clin. Endocrinol Metab. 52, 657-664
- (45) Gärtner R., Hainzinger A., Horn K., Pickardt R.C.
(1983)
Evidence for autonomous thyroglobulin release
from euthyroid and hyperthyroid nodular goiter -
thyroglobulin, a possible helpful parameter in
diagnosis of non-malignant thyroid disorders
Klin. Wochenschr. (1983) 61, 737-741
- (46) Gärtner R., Greil W., Jürgens Ch., Horn K. (1984)
Abnormal thyroglobulin pattern in serum of
patients with thyroid follicular carcinoma
detected by immunoblotting technique
Acta Endocrinol. (Kbh.), Suppl. 264 (105), 52-53
- (47) Gärtner R., Bechtner G., Greil W., Horn K.,
Pickardt C.R. (1985)
Characterization of microheterogeneity of human
thyroglobulin from different thyroid disorders
Acta Endocrinol. 109, 76-82

-
- (48) Gavaret J.M., Cahnmann H.J., Nunez J. (1981)
Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin
J. Biol. Chem. 256 (17), 9167-9173
- (49) Görg A., Postel W., Westermeier R. (1978)
Ultrathin-layer isoelectric focusing in
polyacrylamide gels on cellophane
Anal. Biochem. 89, 60-70
- (50) Görg A., Postel W., Westermeier R. et al. (1980)
Gel gradient electrophoresis, isoelectric
focusing and two dimensional techniques in
horizontal, ultrathin polyacrylamide layers
J. Biochem. Biophys. Methods 3, 273-284
- (51) Helenius A., Simons K. (1975)
Solubilization of membranes by detergents
Biochim. Biophys. Acta 415, 29-79
- (52) van Herle A.J., Vassart G., Dumont J.E. (1979)
Control of thyroglobulin synthesis and secretion
(first of two parts)
N Engl. J. Med. 301 (5), 239-249
- (53) van Herle A.J., Vassart G., Dumont J. (1979)
Control of thyroglobulin synthesis and secretion
(second of two parts)
N. Engl. J. Med. 301 (6), 307-314
- (54) Herzog V. (1981)
Transepithelial transport of thyroglobulin in
inside-out-follicles
J. Cell Biol. 91, 416a
- (55) Hjertén S. (1962)
A new method for preparation of agarose for gel
electrophoresis
Biochim. Biophys. Acta 62, 445-449

-
- (56) Honbo K.S., van Herle A.J., DiStefano J.J. (1978)
Peripheral metabolism of thyroglobulin in the rat
Clin. Res. 26, 106A
- (57) Horn K., Landgraf R., Ruhl T., Scriba P.C. (1969)
Verbesserte mikrochemische Jodbestimmung von
Schilddrüsenhormonen
Z. Anal. Chem. 252, 267-270
- (58) van den Hove-Vandenbroucke M.F. (1980)
Secretion of thyroid hormones
in: The Thyroid Gland (ed. M. de Visscher)
Raven Press, New York
- (59) Jeffreys A.J., Flavell R.A. (1977)
The rabbit β -globin gene contains a large insert
in the coding sequence
Cell 12, 1097-1108
- (60) Jeppson J.O., Franzen B., Gaal A.B. (1980)
Simplified determination of haemoglobin A_{1c} in
diabetic patients by use of electrofocusing
in: "Electrophoresis '79" (Radola B.J. ed.)
Walter de Gruyter, Berlin-New York, 655-661
- (61) Johansson B.G., Hjertén S. (1974)
Electrophoresis, crossed immunoelectrophoresis
and isoelectric focusing in agarose gels with
reduced electroendosmotic flow
Anal. Biochem. 59, 200-213
- (62) King J., Laemmli U.K. (1971)
Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage
T4
J. Mol. Biol. 62, 465-477

-
- (63) Koenig R.J., Peterson C.M., Jones R.L. et al.
(1976)
Correlation of glucose regulation and
haemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus
New Eng. J. Med. 295, 417-420
- (64) Kohler H., Wildberger E., Kohler J. (1982)
Inhibition of Peroxidase and Glucoseoxidase
Activity by H₂O₂ and Iodide
Ann. Endocrinol. (Paris) 43 : 71 A
- (65) Laemmli U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the
assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685
- (66) Lamas L., Covelli I., Edelhoeh H. Cortese F.
Salvatore G. (1971)
Relationships between structure of thyroglobulin
and synthesis of thyroxine
in: Further Advances in Thyroid Research (ed.
Fellinger K. Höfer R.)
Wien: Verlag Wiener Med. Akad. 1, 201-209
- (67) Lejeune P.J., Marriq C., Rolland M., Lissitzky S.
(1983)
In vitro and in vivo iodination of human
thyroglobulin in relation to hormone release
FEBS Lett. 156 (1), 77-82
- (68) Lejeune P.J., Marriq C., Rolland M., Lissitzky S.
(1983)
Amino acid sequence around an hormonogenic thyro-
sine residue in the N-terminal region of human
thyroglobulin after in vivo and in vitro
iodination
Biochem. Biophys. Res. commun. 114, 73

-
- (69) Lingappa V.R., Lingappa J.R., Prasad R.,
Ebner K.E., Blobel G. (1978)
Coupled cell free synthesis and segregation, and
core glycosylation of a secretory protein
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2338-2342
- (70) Lissitzky S., Torresani J., Burrow G.N.,
Bouchilloux S., Chabaud O. (1975)
Defective thyroglobulin export as a cause of
congenital goitre
Clin. Endocrinol. (Oxf.) 4, 363-392
- (71) Lissitzky S. (1984)
Thyroglobulin entering into molecular biology
J. Endocrinol. Invest. 7, 65-76
- (72) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L.,
Randall R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin-Phenol-
Reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-274
- (73) Mahadik S.P. et al. (1976)
Anal. Biochem. 76, 615-633
- (74) Margolis J., Kenrick K.G. (1967)
Biochem. Biophys. Res. comm. 27, 68-73
- (75) Margolis J., Wrigley C.W. (1975)
J. Chromatog. 106, 204-209
- (76) Marriq C., Arnaud C., Rolland M., Lissitzky S.
(1980)
An approach to the structure of thyroglobulin.
Hormone forming sequences in porcine
thyroglobulin
Eur. J. Biochem. 111, 33

-
- (77) Marriq C., Rolland M., Lissitzky S. (1982)
Structure-function relationship in thyroglobulin:
amino acid sequence of two different containing
peptides form porcine thyroglobulin
EMBO J. 1, 397
- (78) Marriq C., Rolland M., Lissitzky S. (1983)
Amino acid sequence of the unique
3,5,3'triiodothyronine-containing sequence form
porcine thyroglobulin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 206
- (79) Massi G., Crivelli F. (1978)
Different behaviour of 19S thyroglobulin
extracted form normal thyroid, simple goitre and
toxic goitre in polyacrylamide slab gel
isoelectric focussing
Acta Endocrinol. (Kbh.) 89, 296-302
- (80) Maurer H.R. (1971)
Disc electrophoresis and related techniques of
polyacrylamid gel electrophoresis
De Gruyter Verlag Berlin-New York, 1971
- (81) Maurizis J.C., Marriq C., Rolland M.,
Lissitzky S. (1983)
Thyroid hormone synthesis and reactivity of hor-
mone-forming tyrosine residues of thyroglobulin
FEBS Lett. 132, 29-32
- (82) Mercken L., Simons M.J. Vassart G. (1982)
The 5'- end of bovine thyroglobulin mRNA encodes
a hormonogenic peptide
FEBS Lett. 149, 285
- (83) Mercken L., Simons M.J., Swillens S.,
Christophe D. (1983)
Partial sequencing of bovine thyroglobulin mRNA
Ann. Endocrinol (Paris) 44, 26A

-
- (84) Michel R., Rall J.E., Roche J., Tubiana M. (1964)
Thyroidal iodoproteins in patients with goitrous
hypothyroidism
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 352-358
- (85) Monaco F., Robbins J. (1973)
Defective thyroglobulin sythesis in an
experimental rat thyroid tumor
J. Biol. Chem. 248, 1595-1599
- (86) Monaco F., Andreoli M., Beretta-Angiussola A.
(1974)
Isolation and characterization of soluble and
particulate thyroid iodoproteins in human
congenital goiter
Horm. Res. 5, 141-155
- (87) Monaco F., Monaco G., Andreoli M. (1975)
Thyroglobulin biosynthesis in "cold" and "hot"
nodules in the human thyroid gland
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41 (2), 253-259
- (88) Monaco F., Salvatore G., Robbins J. (1975)
The site of sialic acid incorporation into
thyroglobulin in the thyroid gland
J. Biol. Chem. 250 (4), 1595-1599
- (89) Morell A.G., Gregoriadis G.N., Scheinberg I.H.
et al. (1971)
The role of sialic acid in determining the
survival of glycoproteins in the circulation
J. Biol. Chem. 246, 1461-1467
- (90) de Nayer Ph., Vassart G. (1980)
Structure and biosynthesis of thyroglobulin
in: The Thyroid Gland, M. de Visscher (Ed.),
Raven Press New York, 1980, 21-37

-
- (91) Nee T.W. (1975)
Theory of electroosmosis effect in
electrophoresis
J. Chromatogr. 105, 231-249
- (92) Newby A.C., Chrambach A., Bailyes E.M. (1982)
The choice of detergents for molecular charac-
terization and purification of native intrinsic
membrane proteins
Techniques in Lipid and Membrane Biochemistry
B 409, 1-22
- (93) Nunez J., Mauchamp J., Pommier J., Circovic T.
(1966)
Biogénèse de la thyroglobuline: Les transitions
d'halogénéation
Biochim. Biophys. Acta. 127, 112-127
- (94) Nunez J. (1980)
Iodination and Thyroid Hormone Synthesis
in: The Thyroid Gland, edited by M. de Visscher,
Raven-Press, New York
- (95) van Ommen G.-G.B., Sterk A., Arnberg A.G.,
de Vijlder J.J.M. (1983)
Structure of coding and flanking sequences of
normal and defective goat thyroglobulin gene
Ann. Endocrinol. (Paris) 44, 32A
- (96) van Ommen G.-J.B., Arnberg A., Baas F.,
Brocas H., Sterk A., Tagelaers W.H.H., Vassart G.
(1983)
The human thyroglobulin gene contains two
15-17 kb in trons near its 3'-end
Nucleid Acids Res. 11, 2273
- (97) Ornstein L. (1964)
Disc electrophoresis I, background and theory
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349

-
- (98) Pammenter M., Albrecht C., Liebenberg, N.v.d.W.,
van Jaarsveld P. (1978)
Afrikaner cattle congenital goiter; characteri-
stics of its morphology and iodoprotein pattern
Endocrinology 102, 954-965
- (99) Peterson G.L. (1977)
Anal. Biochem. 83, 346-356
- (100) Pohl V., Targovink H., Christophe D., Brocas H.,
Cabrer B., Vassart G. (1983)
Analysis of the 5' region of the human
thyroglobulin gene
Ann. Endocrinol (Paris) 44, 31A
- (101) Radola B.J. (1969)
Thin-layer isoelectric focusing of proteins
Biochim. Biophys. Acta, 194, 335-338
- (102) Radola B.J. (1974)
Isoelectric focusing in layers of granulated
gels
II. Preparative isoelectric focusing
Biochem. Biophys. Acta 386, 181-195
- (103) Radola B.J. (1980)
Ultrathin-layer isoelectric focusing in 500 -
100 um polyacrylamide gels on silanized glass
plates or polyester films
Electrophoresis I, 43-56
- (104) Ragetli H.W., Weintraub M. (1966)
Agar derivatives for gel electrophoresis
requiring reduced endosmotic liquid flow
Biochim. Biophys. Acta 112, 160-167

-
- (105) Rawitch A.B., Chernoff S.S., Litwer M.R.,
Rouse J.B., Hamilton J.W. (1983)
Thyroglobulin-structure function.
The amino acid sequence surrounding thyroxine
J. Biol. Chem. 258, 2079
- (106) Raymond S., Weintraub L.S. (1959)
Science, Washington 130, 711
- (107) Reynolds J.A., Tanford C. (1970)
The gross conformation of protein-sodium dodecyl
sulfate complexes
J. Biol. Chem. 245 (19), 5161-5165
- (108) Rilbe H. (1973)
Isoelectric Focusing: A. Theory and Methodology
(Part I)
Historical and theoretical aspects of
isoelectric focusing
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 11-22
- (109) Ritchie R.F., Smith R. (1976)
Immunofixation I. General principles and
application to agarose gel electrophoresis
Clin. Chem. 22, 497-499
- (110) Rolland M., Bismuth J., Fondarai J., Lissitzky S.
(1966)
Composition en acides aminés de la thyroglobuline
de différentes espèces animales
Acta Endocrinol. (Kbh.) 53, 286
- (111) Rolland M., Montfort M.F., Lissitzky S. (1973)
Efficiency of thyroglobulin as a thyroid hormone
forming protein
Biochim. Biophys. Acta 303, 338

-
- (112) Ruhl T.H. (1974)
Serumspiegel von Trijodthyronin und Thyroxin
Ein Säulenchromatographisches Trennverfahren mit
chemischem Jodnachweis.
Inaugural-Dissertation (LMU-München)
- (113) Salvatore G., Edelhoeh H. (1973)
Chemistry and biosynthesis of thyroid
iodoproteins
in: Hormonal Proteins and Peptides, Vol. 1
(ed. Li C.H.) 201-241, Academic Press, New York
- (114) Salvatore G., Stanbury J.B., Rall J.E. (1980)
Inherited defects of thyroid hormone biosynthesis
The Thyroid Gland (ed. M. De Visscher)
Raven Press, New York 1980
- (115) Sandell E.B., Kolthoff J.M. (1937)
Microdetermination of Iodine by a Catalytic
Method
Microchim. Acta 1, 9
- (116) Shapiro A.L., Vinuela E., Maizel J.V. (1967)
Molecular weight estimation of polypeptide
chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide
gels
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28 (5), 815-820
- (117) Silva E.J., Santelices R., Kishihara M.,
Schneider A. (1984)
Low molecular weight thyroglobulin leading to a
goiter in a 12-year-old girl
J. Clin. Endocrinol. Metab. 58 (3), 526-534
- (118) Spiro R.G., Spiro M.J. (1966)
Glycoprotein biosynthesis: Studies on
thyroglobulin
J.Biol. Chem. 252, 1271-1282

-
- (119) Spiro M.J. (1970)
Studies on the protein portion of thyroglobulin.
Amino acid composition and terminal amino acids
of several thyroglobulins
J. Biol. Chem. 245, 5820
- (120) Spiro M.J. (1977)
Presence of a glucuronic acid-containing
carbohydrate unit in human thyroglobulin
J. Biol. Chem. 252, 5424-5430
- (121) Stanbury J.B., Morris M.L. (1958)
Deiodination of diiodotyrosine by cell-free
systems
J. Biol. Chem. 233, 106-108
- (122) Stolc V. (1961)
Optimal Conditions for the Catalytic Action of
Iodine in the Sandell Kolthoff Reaction
Microchim. Acta (Wien), 5, 710-720
- (123) Svensson H. (1961)
Isoelectric fractionation, analysis and charac-
terization of ampholytes in natural pH gradients
I. The differential equation of solute concen-
trations at a steady state and its solution for
simple cases
Acta Chem. Scand. 45, 325-341
- (124) Svensson H. (1962)
Isoelectric fractionation and characterization
of ampholytes in natural pH gradients
II. Buffering capacity and conductance of
isoionic ampholytes
Acta Chem. Scand. 16, 456-466

-
- (125) Svensson H. (1962)
Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients
III. Description of apparatus for electrolysis in columns stabilized by density gradients and direct determination of isoelectric points
Arch. Biochem. Biophys. Suppl. I, 132-136
- (126) Thorun W. (1971)
Der Molekularsiebeffekt bei der Polyacrylamid-gel-Elektrophorese als Funktion von Molekülgröße, Gelkonzentration und Gelvernetzung sowie seine Anwendung zur Molekulargewichtsbestimmung
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem., 9.Jg., 3-12
- (127) Ui N. (1972)
Electrophoretic mobility and isoelectric point of hog thyroglobulin
Biochim. Biophys. Acta 257, 350-364
- (128) Vassart G., Refetoff S., Brocas H., Dinsart C., Dumont J.E. (1975)
Specific synthesis of thyroglobulin on membrane bound thyroid ribosomes
FEBS Lett., 23, 53-56
- (129) Vassart G., Refetoff S., Brocas H., Dinsart C., Dumont J.E. (1975)
Translation of a thyroglobulin 33S messenger RNA as a mean of determining thyroglobulin quaternary structure
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3839
- (130) Vassart G., Brocas H. (1980)
Restriction mapping of synthetic thyroglobulin structural gene as a mean of investigating thyroglobulin structure
Biochim. Biophys. Acta 610, 189

-
- (131) Vesterberg O., Svensson H. (1966)
Isoelectric Fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients
IV. Further studies on the resolving power in connection with the separation of myoglobins
Acta Chem. Scand. 20, 820-834
- (132) Vesterberg O. (1969)
Synthesis and Isoelectric fractionation of carrier ampholytes
Acta Chem. Scand. 23, 2653-2666
- (133) Vesterberg O. (1973)
Isoelectric focusing: A. Theory and Methodology (Part I)
Physicochemical properties of the carrier ampholytes and some biochemical applications
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 23-33
- (134) Vesterberg O. (1979)
Isoelectric focusing of proteins in agarose gels and detection of the proteins by different staining procedures
in: "Electrophoresis '79", Elsevier/North Holland
- (135) van Voorthhuizen W.F., Dinsart C., Flavell F.A., de Vijlder J.J.M., Vassart G. (1978)
Abnormal cellular localization of thyroglobulin mRNA associated with hereditary congenital goiter and thyroglobulin deficiency
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 74-78

-
- (136) Wadström T., Smyth C.J. (1975)
Some applications of a zymogram method in combination with isoelectric focusing in polyacrylamide gels
in: Isoelectric Focusing (Arbuthnott J.P., Beeley J.A. eds.), Butterworths, London, 1975, 152-177
- (137) Warren L. (1959)
The thiobarbituric acid assay of sialic acids
J. Biol. Chem. 234, 1971-1975
- (138) Weber K., Osborn M. (1969)
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 244 (16), 4406-4412
- (139) Wellner D., Hayes M.B. (1973)
Isoelectric focusing: A. Theory and Methodology (Part I)
Isoelectric focusing in polyacrylamide gels
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 34-43
- (140) Whitaker, J.R. (1963)
Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex.
Anal. Chem. 35, 1950-1953
- (141) Williams A.R., Salaman M.R., Koeth H.W. (1973)
Microheterogeneity and allomorphy of proteins
Ann. N.Y. Acad. Sci. 209, 210
- (142) Williams R.R., Waterman R.E. (1929/1930)
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 27, 56
- (143) Woodbury D.M., Woodbury J.W. (1963)
J. Physiol. (London) 169, 553-567

- (144) Wright Jr. C.L. et al. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 295, 396-411

Lebenslauf

Am 29. August 1958 wurde ich in Oberstdorf/Oberallgäu geboren. Zusammen mit meinem drei Jahre älteren Bruder wuchs ich bei meinen Eltern, dem Zollamtmann Eberhard Bechtner und seiner Frau Brunhilde, geborene Strecker, auf.

Im September 1965 trat ich in die Volksschule Langquaid/ Niederbayern ein und wechselte im Dezember 1965 in die Volksschule an der Simmernstraße in München. 1969 bis 1978 besuchte ich das neusprachliche Oskar-von-Miller-Gymnasium in München und legte im Juni 1978 die Abiturprüfung ab.

Im November des gleichen Jahres begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München. 1980 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, 1981 den Ersten und 1983 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Am 23.10.1984 legte ich die Ärztliche Prüfung ab, und am 7.11.1984 wurde mir die Approbation als Arzt vom Bayerischen Staatsministerium des Innern erteilt.

Vom 4.3.1985 bis 31.5.1986 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt am Flugmedizinischen Institut der Luftwaffe in Fürstenfeldbruck.

Meine Promotionsarbeit habe ich im November 1981 in der endokrinologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München bei Herrn Prof.Dr.med.K.Horn, unter besonderer Betreuung von Herrn Dr.med.R.Gärtner begonnen.

